

# **Efectos de la nutrición nitrogenada y el pH del medio sobre la acidificación rizosférica y el crecimiento de las plantas de algodón, girasol y soja**

*Tesis presentada para optar al título de Magister de la Universidad de Buenos Aires,*

*Área Producción Vegetal*

**Nestor Augusto Gomez**

Ingeniero Agrónomo - Universidad Nacional de Santiago del Estero - 2005

Lugar de trabajo: Facultad de Agronomía UBA



Escuela para Graduados Ing. Agr. Alberto Soriano

Facultad de Agronomía – Universidad de Buenos Aires

## COMITÉ CONSEJERO

Director de tesis  
**Gerardo Rubio**  
 Ingeniero Agrónomo (UBA)  
 Doctor en Ciencias Agropecuarias (UBA)

Consejero de Estudios  
**Diego Cosentino**  
 Ingeniero Agrónomo (UBA)  
 Doctor (AgroParisTech-INAPG)

Consejero de Estudios  
**Oscar Péterlin**  
 Ingeniero Agrónomo (UCSF)

## JURADO DE TESIS

Director de tesis  
**Gerardo Rubio**  
 Ingeniero Agrónomo (Universidad de Buenos Aires )  
 Doctor ( Universidad de Buenos Aires )

JURADO  
 Adriana Graciela Kantolic  
 Título de grado (Universidad de Buenos Aires)  
 Doctora (Universidad de Buenos Aires)

JURADO  
 Gustavo Ferraris  
 Ingeniero Agrónomo (Universidad de Buenos Aires )  
 Magister (Universidad de Mar del Plata)

JURADO  
**Gerardo Rubio**  
 Ingeniero Agrónomo (Universidad de Buenos Aires )  
 Doctor ( Universidad de Buenos Aires )

Fecha de defensa de la tesis: 21 de Abril de 2016

## DEDICATORIA

A Mabel, Lourdes, Agustina y Pilar  
A mis padres Nestor y Juana,  
A mis hermanos.

## AGRADECIMIENTO

A Gerardo Rubio por contribuir a mi crecimiento y formación.

A los consejos de Oscar Peterlín, que desde lejos me fue guiando.

A docentes y no docentes de la Cátedra de Fertilidad y Fertilizantes de la UBA que me brindaron su amistad y hospitalidad.

A mis amigos y compañeros con los que compartimos muchas horas de trabajo y supieron acompañar en momentos críticos: María Julia, Mariana Fernandez, Daniela Russi, María Marta, Florencia Varela, Agustina Branzini, Hernán Belinque, Esteban Mosso, Oscar Vaquero, Carolina, Vanina, Salvador Prieto, Matías Romani y Nacho Fernandez Sola.

A Gabriela Negro, Julieta Robredo, Norwen, Patric que me ayudaron en las evaluaciones de los ensayos.

También a Tito, al trio de Jorge

A todos ellos gracias....

## DECLARACIÓN

*Declaro que el material incluido en esta tesis es, a mi mejor saber y entender, original producto de mi propio trabajo (salvo en la medida en que se identifique explícitamente las contribuciones de otros), y que este material no lo he presentado, en forma parcial o total, como una tesis en ésta u otra institución.*

# ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA.....	III
AGRADECIMIENTO .....	IV
DECLARACIÓN.....	V
ÍNDICE GENERAL .....	VI
ÍNDICE DE TABLAS .....	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	X
ABREVIATURAS .....	XIII
RESUMEN .....	XIV
ABSTRACT .....	XV
CAPÍTULO 1: .....	1
I INTRODUCCIÓN GENERALI.....	1
1.1 Rizósfera y sus propiedades.....	2
1.2 Factores que alteran el pH rizosférico .....	2
1.3 Objetivos e Hipótesis Generales .....	6
CAPÍTULO 2: .....	8
EFECTOS DE LAS FUENTES NITROGENADAS Y NIVELES DE pH SOBRE LA LIBERACIÓN DE PROTONES EN LA RIZÓSFERA DEL GIRASOL Y ALGODÓN	8
2.1 INTRODUCCIÓN .....	9
2.1.2 Objetivos e Hipótesis .....	11
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
2.2.1 Material vegetal.....	11
2.2.2 Condiciones experimentales.....	12
2.2.3 Determinaciones:.....	14
2.2.4 Análisis estadístico .....	16
2.3 RESULTADOS .....	16
Especie: Girasol.....	16
2.3.1. Parámetros del crecimiento.....	16
2.3.2 Morfología radical .....	17
2.3.3 Concentración de N.....	20
2.3.4 Liberación de H <sup>+</sup> .....	21
Especie: Algodón.....	22
2.3.5 Parámetros del crecimiento.....	22
2.3.6 Concentración de N y morfología radical. ....	24
2.3.7. Liberación de H <sup>+</sup> .....	24
2.4 DISCUSIÓN .....	25
2.5 CONCLUSIONES .....	27
CAPITULO 3: .....	28
ACIDIFICACIÓN RIZOSFÉRICA EN SOJA: ROL DE LA NUTRICIÓN NITROGENADA Y EL pH DEL MEDIO .....	28
3.1 INTRODUCCIÓN .....	29

3.1.1 Objetivos e Hipótesis .....	31
3.2 MATERIALES Y METODOS .....	31
Experimento I y II.....	31
3.2.1 Condiciones experimentales:.....	31
3.2.2 Determinaciones:.....	34
3.2.3 Análisis estadístico .....	34
3. 3. RESULTADOS: .....	35
Experimento I.....	35
3.3.1 Parámetros de crecimiento.....	35
3.3.2 Morfología radical .....	37
3.3.3 Liberación de H <sup>+</sup> : .....	39
Experimento II.....	40
3.3.4 Parámetros de crecimiento: .....	40
3.3.5 Concentración de N en planta: .....	41
3.3.6 Efectos de los factores N y pH sobre la nodulación .....	42
3.3.7 Liberación de H <sup>+</sup> .....	44
3.4. DISCUSIÓN .....	46
3.4.1 Efecto de fuente de N sobre parámetros de crecimiento y absorción de N .....	46
3.4.2 Concentración de N en plantas.....	47
3.4.3 Efectos del N y del pH sobre la nodulación.....	48
3.4.4 Liberación de H <sup>+</sup> al medio de crecimiento .....	48
3.5 CONCLUSIONES .....	49
CAPÍTULO 4 .....	50
4. DISCUSIÓN GENERAL .....	51
4.1 Contratación de Hipótesis .....	55
4.2 Aportes más sobresalientes de esta tesis .....	56
4.3 Líneas de investigación que surgen de los resultados de esta tesis .....	56
5 BIBLIOGRAFIA .....	58
ANEXO.....	77

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.2.1. Composición química de las soluciones nutritivas para el pretratamiento y tratamiento y las distintas formas de N suministradas. ....	13
Tabla 2.3.1 Valores de “p” para variables de biomasa total, aérea, radical y relación raíz-tallo cuando son tratados con las fuente de N y niveles de pH y su interacción N x pH en plantas de girasol de 32 DDS. Tabla 2.3.1 Valores de “p” para variables de biomasa total, aérea, radical y relación raíz-tallo cuando son tratados con las fuente de N y niveles de pH y su interacción N x pH en plantas de girasol de 32 DDS.....	16
Tabla 2.3.2 Valores de “p” para variables de longitud radical total, longitud específica radical, área radical total, área específica radical y diámetro promedio radical, cuando son tratados con las fuente de N y niveles de pH y su interacción N x pH en plantas de girasol de 32 DDS. ....	18
Tabla 2.3.3 Valores de “p” para Concentración de N ( $\mu\text{g de N mg}^{-1}$ PS vegetal) y N total ( $\text{mg de N planta}^{-1}$ ) en plantas de girasol, cuando son tratados por los factores fuente de N y niveles de pH, y su interacción, a los 32 DDS. ....	20
Tabla 2.3.4 Valores de “p” para biomasa total, aérea, radical y relación raíz-tallo (R/T) cuando son tratados con las fuente de N y niveles de pH y su interacción N x pH en plantas de algodón de 32 DDS. ....	23
Tabla 3.2.1. Composición nutritivas de las soluciones empleadas en el pretatamiento y tratamiento de los experimentos I y II. ....	32
Tabla 3.2.2 Etapas, duración en días, solución del medio, pH de crecimiento para los experimentos I y II en soja.....	33
Tabla 3.3.1 Resultados de Anova y valores de “p” para los parámetros de crecimiento a los 33 DDS en plantas de soja, Experimento I.....	35
Tabla 3.3.2 Anova y valores de “p” para variables morfológicas de raíz en plantas de soja, de 33 DDS. Experimento I. LRT: longitud radical total; LER: longitud específica radical; ART: área radical total; AER: área específica total y diámetro promedio radical.....	38
Tabla 3.3.3 ANOVA y valores de “p” para las variables de crecimiento, flujo de $\text{H}^+$ y concentración de N y N total, en plantas de soja de 41 DDS. Las medias son indicadas cuando los factores principales den significancia ( $p < 0,05$ ) y no la interacciones. Experimento II. ....	40
Tabla 3.3.4 Resultado del ANOVA y valores de “p” para: mg de nódulos por planta <sup>-1</sup> , número de nódulo por planta-1 y nodulación específica(mg de nódulo por g de	



raíz y número de nódulo por g de raíz), en función del pH, fuente de N y DDS en plantas de soja de 41 DDS. Experimento II .....	43
A diferencia de los parámetros de crecimiento, los .....	49
Tabla A 1 Valores de “p” para biomasa total, aérea, radical y relación raíz-tallo (R/T) cuando son tratados con los factores fuente de N niveles de pH y su interacción en plantas de algodón de 32 DDS .....	78
Tabla A 2 Resultados de Anova y valores de “p” para la tasa de crecimiento de las plantas (TCP) hasta los 33 DDS en plantas de soja del Experimento I.....	78

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.2.1. Etapas y duración en días del experimento: germinación, pretratamiento y tratamiento. ....	13
Figura 2.2.2 Medición de liberación de H <sup>+</sup> . Sistema de recipientes y tubos de ensayos para medición de H <sup>+</sup> en la rizósfera de las raíces de las plantas. ....	15
Figura 2.3.1. Parámetros de crecimiento: biomasa total, biomasa aérea, biomasa radical, expresados en (g) y la relación raíz-tallo para plantas de girasol, para los tratamientos con fuentes de N y niveles de pH del medio a los 32 DDS. Las barras indica el error estándar de las medias. Letras iguales no difieren entre si y a<b<c. ....	17
Figura 2.3.2. Morfología radical de las plantas de girasol: longitud radical total(LRT), longitud específica radical (LER), área radical total(ART), área específica radical(AER), y diámetro radical promedio para los tratamientos de fuente de N y niveles de pH, evaluadas a los 32 DDS. Tratamientos con la misma letra no difieren significativamente con un p< 0,05 y donde a < b < c .Las barras representan el error estándar de las medias.....	19
Figura 2.3.3. Concentración de N ( $\mu\text{g}$ de N $\text{mg}^{-1}$ de PS vegetal o M.S) y contenido total de N (mg de N por planta) en plantas de girasol de 32 DDS, bajo diferentes tratamientos de fuente de N y niveles de pH. Tratamientos con la misma letra no difieren entre sí, donde a < b < c; Significancia p< 0.05 *. Las barras indican el error estándar de la media. ....	20
Figura 2.3.4 Efecto de las fuentes de N y los niveles de pH sobre la liberación de H <sup>+</sup> expresados en $\mu\text{mol}$ de H <sup>+</sup> $\text{g}^{-1}\text{PF h}^{-1}$ para el girasol de 32 DDS. Las barras con valores por debajo de cero (-) o por arriba el cero (+) indicarían una alcalinización o una acidificación al medio respectivamente. Las barras indican el error estándar de las medias. ....	21
Figura 2.3.5. Parámetros de crecimiento: biomasa total, biomasa aérea, biomasa radical, expresados en (g) y la relación raíz-tallo para plantas de algodón de 32 DDS, tratadas con las distintas fuentes de N y niveles de pH del medio. Tratamientos con la misma letra no difieren significativamente con un p< 0,05 para la interacción y a < b < c. Las barras indica el error estándar de las medias.....	23
Figura 2.3.6. Efecto de las fuentes de N y los niveles de pH sobre la liberación de H <sup>+</sup> expresados en $\mu\text{mol g}^{-1}\text{PF h}^{-1}$ para plantas de algodón a los 32 días de crecimiento. Valores negativos (-) indican una alcalinización al medio y positivos (+) una acidificación. Las barras indican el error estándar de las medias. ....	24
Figura 3.3.1. Efecto de Fuentes de N y pH para biomasa total, aérea, radical y relación raíz-tallo para Soja, Experimento I, a los 33 DDS. Las barras indican el error	

estándar. Letras similares no presentan diferencias entre tratamientos al nivel 0,05 y $a < b < c$ .....	36
Figura 3.3.2. Experimento I, evolución de la tasa de crecimiento de las plantas (TCP), expresado en g por día, para sucesivas cosechas 22, 28 y 33 DDS en plantas de soja. Se indica a las fuentes de N (Inoculadas, $\text{NH}_4^+$ , $\text{NO}_3^-$ y $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) como promedio de los tres pH. Letras similares no presentan diferencias entre tratamientos al nivel 0,05 y $a < b < c$ . ....	37
Figura 3.3.3. Efecto de Fuentes de N y pH para morfología radical: longitud radical específica (LER), área radical específica (AER), longitud total por planta (LRT), área total por planta (ART) y diámetro promedio de raíces en Soja, Experimento I; barras error estándar. ....	38
Figura 3.3.4. Efecto de las fuentes de N y los niveles de pH sobre la liberación de $\text{H}^+$ expresados en $\mu\text{mol g}^{-1}\text{PF h}^{-1}$ para Soja, Experimento I, a los 33 DDS. Valores negativos (-) indican una alcalinización al medio rizósferico y positivos (+) una acidificación. Las barras indican el error estándar de las medias. Letras similares no difieren entre tratamiento para un $p < 0,05$ y $a < b < c$ . ....	39
Figura 3.3.5. Experimento II, efecto de las fuentes de N y pH para biomasa total, biomasa aérea, biomasa radical y relación raíz-tallo a los 41 DDS en plantas de soja,. Las barras indican el error estándar de los tratamientos.....	41
Figura 3.3.6. Concentración de N expresada en $\text{mg g}^{-1}$ y contenido total de N expresados en $\text{mg planta}^{-1}$ a los 41 DDS. Plantas de Soja, Experimento II. Las barras indican error estándar, con un alfa de 0,05.....	41
Figura 3.3.7. Experimento II. Panel derecha muestra la nodulación total en $\text{mg nódulos total planta}^{-1}$ y número de nódulos totales por $\text{planta}^{-1}$ , durante sucesivas cosechas a los días 26, 33 y 41 desde la siembra. El panel izquierdo muestra a la nodulación específica en $\text{mg de nódulos por g de raíz}^{-1}$ y número de nódulos por $\text{g raíz}^{-1}$ a los 26, 33 y 41 DDS. ....	42
Figura 3.3.8. Peso promedio de nódulos en función de la biomasa radical y número de nódulos $\text{g de raíz}^{-1}$ , en cosechas a los 26, 33, 41 DDS, para los tratamientos Inóculo y N + Inóculo Soja, Experimento II.....	44
Figura 3.3.9. Liberación de $\text{H}^+$ en la rizósfera de plantas de soja expresados en $\mu\text{mol g}^{-1}\text{PF h}^{-1}$ , para los tratamientos: inoculado, N + inoculo y $\text{NH}_4\text{NO}_3$ en combinación con los pH 4,5 – 6,0- 7,5. Experimento II, a los 41 DDS. La figura izquierda, mediciones del flujo de $\text{H}^+$ realizadas en soluciones nutritiva del tratamiento de origen y la figura derecha, realizada en soluciones con agua a los pH de tratamiento. Valores negativos (-) indica una alcalinización a la solución y valores positivos (+) una acidificación a la solución. Barras indican el error estándar para cada tratamiento y letras similares no difieren entre los tratamientos al nivel 0.05 y para medias $a < b < c$ .....	45

- Figura 4.1. Modelo conceptual del flujo de  $H^+$  a nivel Membrana Plasmática. Plantas tratadas con las distintas formas de N y niveles de pH. Se indica el efecto de los tratamientos sobre la acumulación de biomasa total y los signos (+++) indican mayor biomasa producida y (+) la menor. La membrana plasmática separa el medio externo (apoplasto) del interno de la célula. Las flechas orientadas a la izquierda, o hacia el citosol indican un ingreso o absorción de  $H^+$ , mientras flechas a la derecha indican una salida o extrusión de  $H^+$ . ..... 52
- Figura 4.2 Porcentaje de reducción de biomasa total para algodón, girasol y soja (experimento I y experimento II) en relación a la fuente de  $NH_4NO_3$ . ..... 53
- Figura 4.3 plantas de soja en el Experimento II, relación entre la biomasa total de la planta(mg) en función de N total acumulado hasta los 41 DDS. .... 54
- Figura A 1 Concentración de N expresado en  $\mu g$  de N  $mg^{-1}$  de materia seca (PS) y contenido total (mg) de N (N total) por planta de Algodón bajo diferentes fuente de N y niveles de pH. Tratamientos con la misma letra no difieren significativamente con un  $p < 0,05$  para la interacción y  $a < b < c$ . Las barras indican el error estándar de la media. .... 77
- Figura A 2 Características radicales: Longitud radical total ( $m$  planta $^{-1}$ ), longitud específica radical ( $m$   $g^{-1}$ ), área radical total ( $cm^2$  planta $^{-1}$ ) y área específica radical ( $cm^2$   $g^{-1}$ ), y diámetro radical promedio para fuente de N y niveles de pH para plantas de Algodón. Tratamientos con la misma letra no difieren significativamente con un  $p < 0,05$  para la interacción y  $a < b < c$ . Las barras representan el error estándar de las medias ..... 77

## ABREVIATURAS

A.E.R: área específica radical.

A.R.T: área radical total.

DDS: días después de la siembra

$\text{Fe}^{+2}$ : hierro II

$\text{Fe}^{+3}$ : hierro III

$\text{H}^{+}$ : protones

HATs: transportadores de alta afinidad.

h: hora

l: litros

L.E.R: longitud específica radical.

L.R.T: longitud radical total.

LATs: transportadores de baja afinidad.

N total: nitrógeno total en planta.

N: nitrógeno.

$\text{N}_2$ : nitrógeno atmosférico.

$\text{NH}_4^{+}$ : catión amonio

$\text{NH}_4\text{NO}_3$ : nitrato de amonio

$\text{NO}_3^{-}$ : anión nitrato

P: fósforo

PF: peso fresco (biomasa)

PS: peso seco (biomasa)

$\mu \text{mol H}^{+} \text{g}^{-1} \text{PF h}^{-1}$ : micro mol de  $\text{H}^{+}$  por gramos de peso fresco de raíz y por hora.

TCP: tasa de crecimiento de las plantas

## RESUMEN

La rizósfera es el volumen del suelo afectado por la actividad de las raíces. Es un sitio de intensas interacciones entre la planta y el suelo. La liberación de protones ( $H^+$ ) desde las raíces a la rizósfera estaría afectada por varios factores. El objetivo general de esta tesis fue analizar el efecto del pH del medio, la fuente de nitrógeno (N) y su interacción sobre las variables de crecimiento y la liberación de  $H^+$  en la rizósfera de plantas de algodón, girasol y soja. Los ensayos fueron realizados en hidroponia suministrando distintas formas de N ( $NH_4NO_3$ ,  $NH_4^+$ ,  $NO_3^-$ ) a diferentes pH (4,5 – 6,0 – 7,5). El crecimiento de las tres especies de plantas fue afectado significativamente por la forma de N suministrada y no por el pH del medio. Las plantas tratadas con las fuentes  $NH_4NO_3$  y  $NO_3^-$  presentaron el mayor crecimiento. Las plantas de soja inoculadas crecieron menos que las no inoculadas. La liberación de  $H^+$  fue afectada por el pH y en plantas de soja se detectó interacciones con las fuentes de N. El flujo de  $H^+$  fue mayor hacia el interior celular cuando las raíces crecieron en medios ácidos, alcalinizando la rizósfera. Por el contrario, las raíces acidificaron la rizósfera cuando crecieron en medios de pH 6,0 y 7,5. Las plantas de soja tratadas con  $NH_4^+$  acidificaron la rizósfera en todos los rangos de pH. Las restantes fuentes de N siguieron el mismo patrón que en algodón y girasol.

**Palabras claves:** liberación de  $H^+$ , pH, nitrógeno, rizósfera.

## ABSTRACT

The rizosphere is the soil volume affected by the activity of the plant roots. The release of protons ( $H^+$ ) to the rhizosphere is affected by several factors. The general objective of this thesis was to analyse the effect of the pH of the growth media, the source of N and their interaction on the growth and the release of  $H^+$  to the rhizosphere of cotton, sunflower and soybean plants. The plants were grown in hydroponics. Compared treatments comprised sources of N ( $NH_4NO_3$ ,  $NH_4^+$ ,  $NO_3^-$ ) and a range of pH (4,5 - 6,0 and 7,5). Growth of the three species was affected by the N source, but not by the pH level. The treatments with  $NH_4NO_3$  and  $NO_3^-$  presented the highest growth. Inoculated soybean plants grew less than the non-inoculated counterparts that where supplied with inorganic N. The release of  $H^+$  was affected by the pH. Some significant interactions N x pH were found. When the external medium was acid, the root alkalinized the rizosphere, because  $H^+$  influx predominated over  $H^+$  efflux. At pH 6,0 and 7,5, roots acidified the rhizosphere. When the soybean plants grew with  $NH_4^+$ , a stronger rhizosphere acidification was verified at all pH levels. The other N sources followed the same pattern verified in cotton and sunflower.

Key words: release of protons, nitrogen, pH, rhizosphere

## **CAPÍTULO 1:**

### **INTRODUCCIÓN GENERAL**



### 1.1 Rizósfera y sus propiedades

Los nutrientes de la solución del suelo se encuentran en forma de iones inorgánicos. Llegan a la rizósfera por flujo masal, difusión y en menor medida, por intercepción (Marschner 1990). Su concentración en el suelo suele decrecer enormemente- en la vecindad de la raíz debido a la absorción vegetal. Sin embargo, si la absorción es por flujo masal, puede haber acumulación de nutrientes en zonas adyacentes a la raíz. Esto suele ocurrir en nutrientes poco móviles como el calcio y el potasio. (Hylander *et al.* 1999; Hinsinger *et al.* 2009; Calvaruso *et al.* 2011).

La rizósfera es la porción del suelo que se ve afectada de alguna forma por la raíz y se diferencia del seno del suelo. Puede representar entre el 0,1 % y en casos excepcionales más del 5% del volumen total del suelo. El radio de la rizósfera es variable, dependiendo de la propiedad edáfica considerada, la estructura del suelo, tamaño de las partículas, el contenido de agua y la capacidad buffer (Darrah 1993). El límite exterior de este radio se establece cuando ya no hay diferencia en las propiedades del suelo rizosférico y el suelo no rizosférico. En términos de pH, la rizósfera puede tener en promedio un radio de 3 mm. Para fósforo (P) puede oscilar entre 2 y 5 mm y para nitrógeno (N) puede excederse mucho de esos valores (Hinsinger *et al.* 2009). Por otro lado, las micorrizas poseen hifas que se extienden hacia el seno del suelo por lo que pueden extender el radio de la rizósfera.

Las raíces liberan compuestos hacia el medio afectando la actividad biológica y las propiedades físico-químicas del suelo (Lambers *et al.* 2009). Azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos, vitaminas, proteínas, metabolitos secundarios, enzimas, agua, protones ( $H^+$ ) y oxidrilos se encuentran entre los principales compuestos excretados por las raíces (Marschner 1995; Jones *et al.* 2009). Estos compuestos propician el crecimiento de ciertos microorganismos, convirtiendo a la rizósfera en un escenario de intensas interacciones entre éstos, las raíces y la matriz del suelo (Gregory y Hinsinger 1999). Debido a las lógicas dificultades metodológicas, el conocimiento disponible sobre la rizósfera es decididamente menor con respecto al seno del suelo.

### 1.2 Factores que alteran el pH rizosférico

Uno de los factores de mayor contraste entre la rizósfera y el seno del suelo lo da el pH, el cual puede presentar diferencias de hasta varias unidades (Darrah 1993; Yu *et al.* 2000). Los cambios de pH a nivel rizósfera se dan como consecuencia de los compuestos exudados por las raíces (Neumann *et al.* 1999; Hinsinger 2001; Troløve *et al.* 2003), como  $H^+$ , hidroxilos ( $OH^-$ ) o ácidos orgánicos, entre los principales. Estos compuestos químicos liberados al medio derivan de las células radicales que mantienen el pH del citosol a niveles constantes y contrarrestan el desbalance de cargas que se produce con la absorción de nutrientes (Imsande 1986). El mantenimiento del equilibrio del pH citosólico, que normalmente se encuentra en valores cercanos a 7,3, es un proceso bioquímico en el cual intervienen ácidos orgánicos,  $H^+$ ,  $OH^-$  entre otros (Israel y Jackson 1982). Por ejemplo, si la suma de cationes totales que absorbe la planta es mayor a la suma de aniones, las raíces producirán una liberación de  $H^+$  al medio resultando en una acidificación y con una disminución del pH original. Por el contrario si la absorción es mayoritariamente de aniones, la planta liberará  $OH^-$  al medio (o ingresará  $H^+$  a la raíz), resultando en una alcalinización y un aumento del pH (Kirkby y Mengel 1967; Römhild 1986; Imas *et al.* 1997).

En su tesis de Maestría, Faggioli (2008) comparó las eficiencias de absorción del P sobre plantas de soja, girasol y maíz, en distintas localidades de la Región Pampeana. Esas mismas especies también fueron experimentadas en macetas. El tercer medio de crecimiento utilizado por Faggioli (2008) fue la hidroponía, observando que a los 20 días las raíces de las tres especies acidificaron el medio, independientemente de la oferta de P. Las raíces de girasol experimentaron en agar y colorante la mayor tasa de acidificación que soja y maíz. Esta acidificación también fue observada en maceta. La acidificación de las raíces de soja se mantuvo en valores intermedios entre el girasol y el maíz. En maíz la deficiencia de P realzó el descenso de pH del ambiente rizosférico. La mayor tasa de acidificación del girasol no mejoró la eficiencia de adquisición del P como se podría haber esperado para esta especie. Estos resultados sirvieron de base para incursionar en nuevas líneas de investigación, de la cual surgió esta tesis.

Raíces de plantas de algodón, trigo y lupino blanco solubilizaron distintas fracciones de P inorgánico e orgánico producto de una acidificación, provenientes ya sea de una liberación de  $H^+$ , ácidos carboxílicos o fosfatasas (Wang *et al.* 2008). En algodón, la absorción de las fracciones lábiles de P se relacionó con las fosfatasas tanto ácidas como alcalinas y no a la liberación de  $H^+$  o ácidos carboxílicos. Las leguminosas en simbiosis con las bacterias fijadoras de N atmosférico tienen la capacidad de acidificar el medio, como consecuencia de una mayor tasa de absorción de cationes sobre los aniones (Hinsinger *et al.* 2003; Tang *et al.* 2009). Este efecto acidificante de las leguminosas cuando utilizan N fijado fue observado además en alfalfa (Nyatsanga y Pierre 1973; Aguilar y Van Diest 1981) y en lupino (Coventry y Slaterry 1991; Neumann *et al.* 1999). Tang *et al.* (1997) observaron un aumento en la acidificación del seno del suelo en 12 especies de pasturas, luego de 5 años de producción.

Otro factor que podría incidir en el pH de la rizósfera es la respiración de las raíces de las plantas y los microorganismos del suelo. La respiración contribuye al aumento del  $pCO_2$  en los suelos: se han registrado valores entre 30 a 100 veces mayores que la concentración atmosférica (Hinsinger *et al.* 2003). Estas concentraciones pueden ser afectadas por el estado del suelo como anegamiento, costras y compactación. En el suelo y especialmente en la solución de este, el  $CO_2$  se transforma rápidamente en  $HCO_3^-$ , lo que provoca una acidificación a nivel rizósfera. Esto es válido en casi todos los suelos, excepto para aquellos suelos muy ácidos que impide la disociación del  $HCO_3^-$ . En estos suelos se observó que la respiración no contribuye a cambiar en forma significativa el pH rizosférico. En cambio, en suelos calcáreos y neutros el pH del suelo disminuye considerablemente con el incremento de la concentración de  $CO_2$  edáfico (Hinsinger *et al.* 2003). El fenómeno de liberación de ácido carbónico determina que el pH de la rizósfera de suelos calcáreos se encuentre normalmente en valores cercanos a 7 en lugar de 8,3, como estaría determinado por la reacción de equilibrio del  $CaCO_3$  a concentraciones ambientes de  $CO_2$  (Hinsinger *et al.* 2003). En sus experimentos, Nguyen *et al.* 1999 destacaron un efecto pobre del  $pCO_2$  sobre el pH rizosférico, concluyendo que posee una relevancia menor.

En ciertas especies de plantas, los ácidos orgánicos contribuyen de manera importante en el cambio del pH rizosférico. Entre los ácidos orgánicos que participan activamente se encuentran el ácido cítrico, oxálico y málico (Bertin *et al.* 2003; Cawthray 2003; Hinsinger *et al.* 2003), siendo este último el anión dominante en la mayoría de plantas. El oxalato es el dominante en familias como Chenopodiaceae, Polygonaceae y Portulacaceae. Estos ácidos orgánicos provenientes del metabolismo

celular están presentes en grandes concentraciones en el citosol de las células radicales, jugando un rol preponderante en la regulación del pH (Smith y Raven 1976; Kirkby y Knight 1977). Uno de los mecanismos de regulación es su capacidad para almacenarse en vacuolas. Los ácidos orgánicos tienen una constante de disociación baja (pK), por lo cual al ser liberados lo hacen en sus bases conjugadas como aniones orgánicos. Estos aniones tienen que ser balanceados por una equivalente entrada de  $\text{OH}^-$  o salida de  $\text{H}^+$  de la célula radical (Haynes 1990; Hinsinger *et al.* 2003; Wouterlood *et al.* 2004). Los aniones orgánicos, al poseer un pK bajo, generalmente reaccionan con los  $\text{H}^+$  del suelo y en algunos casos su liberación es acompañada por cationes como el  $\text{K}^+$ , por lo tanto su contribución al pH rizosférico puede llegar a ser nula (Jones 1998; Gerke *et al.* 2000 a b). Se observó que los ácidos orgánicos exudados presentan una notoria variación entre especies. Petersen y Bottger (1991) observaron que en maíz era despreciable (0,3%) pero en lupino era muy significativa. Tang *et al.* (2009) destacó una pobre participación de los ácidos carboxílicos exudados en plantas de soja ante deficiencias de P. Wang *et al.* (2008) no detectaron liberación de ácidos orgánicos en plantas de algodón, tratadas en condiciones normales y deficitarias de P.

Otra característica importante a tener en cuenta a la hora de cuantificar los iones exudados por las raíces es la capacidad buffer de los suelos. En suelos que poseen una baja capacidad buffer y un pH cercano a 6 se observaron los mayores cambios de pH. Mientras que en suelos con una capacidad buffer alta no se produjeron cambios importantes de pH (Schubert *et al.* 1990). Schaller (1987) menciona que los  $\text{H}^+$  liberados al medio reaccionan por intercambio de cationes, por protonación-deprotonación de los grupos de ácidos débiles o por la disolución o precipitación de minerales del suelo (reacciones que consumen o producen  $\text{H}^+$ , respectivamente). En consecuencia, se cree que la capacidad buffer del suelo juega un rol importante en los cambios de pH producidos en la rizósfera (Durand y Bellon 1994). Si la capacidad buffer del suelo es alta, el cambio producido a nivel rizósfera será mínimo, por el contrario si la capacidad buffer es baja o pobre la diferencia de pH entre la rizósfera y el seno del suelo será mayor (Hinsinger *et al.* 2003). En tal sentido, la medición directa del pH en la rizósfera no refleja solamente el fenómeno de liberación de exudados radiculares sino que integra la reacción de estos con el seno del suelo.

Otro factor clave en la regulación del pH rizosférico es la forma en que la planta absorbe el N del suelo. Las formas predominante en el suelo son como anión (nitrato -  $\text{NO}_3^-$ ) y como catión (amonio -  $\text{NH}_4^+$ ) (Miller y Cramer 2004). Los mecanismos involucrados en la absorción de las distintas formas de N y la liberación de  $\text{H}^+$  u  $\text{OH}^-$  se dan como consecuencia de la electro neutralidad citosólica que son bastante conocidas (Kirby y Mengel 1967; Marschner 1995). Si la planta absorbe en mayor medida  $\text{NO}_3^-$  el medio sufrirá una alcalinización como consecuencia del equilibrio homeostático celular. Esto se produce por un movimiento denominado antiporter (entrada de un anión  $\text{NO}_3^-$  y salida de un  $\text{OH}^-$ ) o symporter (entrada conjunta de un  $\text{NO}_3^-$  y dos  $\text{H}^+$ ). Si la planta absorbe en mayor medida  $\text{NH}_4^+$  la rizósfera sufrirá una acidificación como consecuencia de la entrada de un catión -  $\text{NH}_4^+$  - y la salida de un  $\text{H}^+$ , generalmente por un movimiento antiporter (Kirkby y Mengel 1967; Haynes y Goh 1978; Marschner 1995). En plantas de soja, Riley y Barber (1971) observaron que las raíces producían una mayor acidificación rizosférica cuando el nitrógeno era suministrado como  $\text{NH}_4^+$  en lugar de  $\text{NO}_3^-$ , resultando en una mayor absorción y acumulación del P en sus tejidos.

La mayoría de las plantas cultivadas generan las mayores tasas de crecimiento cuando están estas dos formas de N ( $\text{NH}_4^+$  y  $\text{NO}_3^-$ ). Sin embargo, el crecimiento se ve deprimido cuando predomina alguna de ellas como fuente principal, lógicamente dependiendo de la especie, la edad y el órgano en cuestión. Schortemeyer *et al.* (1993) observaron una mayor biomasa total alcanzada en maíces de 12 días con el suministro homogéneo de las dos formas de N. Por el contrario, la biomasa total fue menor cuando se les suministró  $\text{NH}_4^+$  o  $\text{NO}_3^-$  individualmente. Hebered y Below (1989) en dos variedades de trigo observaron la mayor biomasa total y rendimiento en granos con una relación de  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  de 50-50 o 75-25. Leidi *et al.* (1992) detectaron el mayor crecimiento con la forma  $\text{NO}_3^-$  que  $\text{NH}_4^+$  en plantas juveniles de algodón. Para *Ricinus communis* Allem y Raven (1987) y Van Beusichem *et al.* (1988) detectaron el mayor crecimiento con la fuente  $\text{NO}_3^-$  que con  $\text{NH}_4^+$ . Imsande (1985) obtuvo la mayor biomasa total con la fuente  $\text{NO}_3^-$  seguida por la forma combinada ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) en plantas de soja de 50 días. Cuando la absorción de la solución del suelo se da con la fuente  $\text{NH}_4^+$  la mayoría de las plantas cultivadas experimentan un cierto grado de toxicidad. El efecto tóxico afecta la tasa de crecimiento (acumulación de materia seca) y en casos severos la tasa de desarrollo (Britto y Kronzucker 2002). Sin embargo Brix *et al.* (2002) en plantas de *Typha latifolia* observaron el máximo crecimiento con la fuente  $\text{NH}_4^+$  que con  $\text{NO}_3^-$ .

La combinación de fuente de N y pH del medio puede generar respuesta disimiles entre especies y dentro de una misma especie, las cuales podrían cambiar durante la ontogenia. Lang y Kaiser (1994) no encontraron diferencias en la biomasa aérea en plantas de cebada, por el contrario la biomasa radical fue afectada por la interacción N x pH. El menor crecimiento radical fue presentado en plantas tratadas con  $\text{NH}_4^+$  y pH ácido (4,0) a diferencia de los pH 5,0 y 6,0 y la forma  $\text{NO}_3^-$  que resultaron en los mayores pesos. Ruan *et al.* (2002) en plantas de “Te” no observaron efecto interactivo entre N x pH para biomasa total, pero si efectos independientes para los factores principales. La mayor biomasa total fueron para aquellas plantas con las fuentes  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , y en un orden decreciente para los pH de  $5 > 4 > 6$ . Tolley-Henry y Raper (1986) también observaron el menor crecimiento en plantas de soja principalmente para ambientes ácidos y fuentes amoniacales ( $\text{NH}_4^+$ ), pero esto se revirtió cuando aumentó el pH del medio. Así también Brix *et al.* (2002) en sus experimentos con *Typha latifolia* no encontraron diferencias para los factores principales (N y pH) en el crecimiento, pero efectos interactivos en la concentración de nutrientes como el P, Ca y K. En el caso de algodón, girasol y soja, son muy escasos los antecedentes sobre los efectos de la fuente de N en el crecimiento, y su interacción con el pH del medio.

El efecto del pH del seno del suelo sobre el pH rizosférico ha sido relativamente poco estudiado (Hinsinger *et al.* 2003) y juega un rol importante en la solubilización y absorción de nutrientes como así también en los procesos de escape frente a la toxicidad de algunos elementos del suelo (Chaignon *et al.* 2002; Hinsinger *et al.* 2003). Jones (1998) y Hinsinger *et al.* (2003) en estudios realizados sobre suelos ácidos y concentraciones elevadas de aluminio, reportaron que genotipos de maíz resistentes tenían la capacidad de absorber más aniones que cationes y alcalinizar su ambiente, posibilitando una aliviación frente a este elemento tóxico (Pellet *et al.* 1995; Heim 2001). Hinsinger *et al.* (2003) reportaron que plantas creciendo en suelos ácidos producen una alcalinización a nivel rizósfera, mientras que aquellas que lo hacían en suelos alcalinos acidifican la rizósfera. Tagliavini *et al.* (1995) observaron algo similar

en suelos de elevado pH (calcáreos y no calcáreos), donde raíces apicales de árboles de *Prunus pérsica* acidificaban su ambiente externo favoreciendo la absorción de nutrientes. Guivarch (1999) observó que la colza produce una alcalinización de la rizósfera en suelos de pH menor a 4,8 y una acidificación en suelos con pH superiores a ese valor. Schubert *et al.* (1990) demostró que raíces de poroto creciendo en medios líquidos liberaban  $H^+$  a pH superiores a 6,0 mientras que alcalinizaban la solución a pH menores a 5,0. Hawkins y Robbins (2010) observaron que plantas de soja cultivadas en medios ácidos producían una alcalinización, producto de la entrada de  $H^+$  al interior celular, y una reducida actividad de las ATP-asa situadas en las MP. A pesar de que existe ciertas evidencias empíricas del fenómeno, no están del todo dilucidados los mecanismos mediante el pH del suelo modifica la eventual acidificación o alcalinización de la rizósfera inducidas por las raíces. Una posible causa reside en que el bajo pH del medio (ácido) podría desencadenar una alteración de la actividad de la ATP-asa, resultando en una disminución de la actividad de la bomba de  $H^+$ , seguido por una reducción en la absorción de nutrientes (Hinsinger *et al.* 2003).

Los cambios de pH en la rizósfera se deben principalmente a la extrusión de  $H^+$  al medio, producida por las raíces de las plantas. Esta liberación de  $H^+$  al medio externo es realizada por unas proteínas situadas en la membrana plasmática (MP) de la raíz, denominadas ATP-asa. Estas tienen como principal función expulsar  $H^+$  generando un gradiente electroquímico y suministrar la fuerza necesaria para la absorción de los iones y metabolitos a través de la MP (Sze 1999).

Investigadores destacaron que la fuente de N es el factor determinante en la liberación de  $H^+$  al medio, mientras que otros sostienen que el pH del medio es el factor principal en la extrusión de  $H^+$ . En algodón y girasol no se encontró bibliografía que cite específicamente el efecto combinado del pH y la fuente de N sobre la liberación de  $H^+$ , en soja solo los aportes citados por Hawkins y Robbins (2010).

En esta tesis se estudiará el efecto de la fuente de N y pH del medio sobre el crecimiento y la acidificación rizosférica promovida desde raíces de las plantas de algodón, girasol y soja.

### 1.3 Objetivos e Hipótesis Generales

Los antecedentes en la literatura indican que la fuente de N sería un factor clave en el crecimiento de la planta y en la liberación de  $H^+$  al medio, como así también lo sería el pH del medio. El objetivo general de esta tesis fue analizar el efecto de la fuente de N y el pH del medio y su interacción sobre las variables de crecimiento y la liberación de  $H^+$  en la rizósfera de las plantas de algodón, girasol y soja.

La hipótesis general que se pondrá a prueba es que el flujo de  $H^+$  en la rizósfera es regulado en mayor magnitud por el pH del medio que por la fuente de N suministrada.

Para responder a la hipótesis se utilizaron como modelo tres especies anuales: algodón, girasol y soja. La elección de las tres especies se basó principalmente por su relevancia económica y social tanto en el ámbito regional, nacional e internacional. La soja es la leguminosa que ocupa cerca de 2/3 partes de la superficie cultivada en el país, siendo la principal oleaginosa a nivel nacional. Se cultiva en distintos tipos de suelos, con variada provisión de N y de niveles de pH edáfico. Por su parte girasol es otra oleaginosa adaptada a diferentes tipos de ambientes. En los tiempos recientes, se han incorporado una amplia gama de materiales adaptables a distintas condiciones. Además de la importancia que representa esta oleaginosa en la industria aceitera, estudios de una

tesis de maestría de la EPG (Faggioli 2008) encontraron que el girasol acidificaba el ambiente rizosférico en mayor magnitud que el maíz y la soja. Tanto la soja como el girasol poseen un rol preponderante en la floreciente industria aceitera nacional posicionándose ventajosamente en la producción de biocombustibles orgánicos (biodiesel). Por su parte el algodón se concentra en la región Norte de la Argentina entre los 25° y 31° de latitud sur. Es un cultivo de importancia económica y social para la región, donde intervienen un gran número de agentes en la cadena productiva. Esto genera una actividad agroindustrial importante con un número elevado de personas participantes en el proceso del cultivo. Su principal destino es la fibra textil para hilanderías y productos secundarios como oleaginosos y alimenticios, empleándose su semilla para la extracción de aceites comestibles e industriales, y también en la alimentación de animales por su alto contenido proteico.

El primer desafío a superar en el presente estudio, fue definir la aproximación metodológica a ser utilizada. La fuerte interacción entre los microorganismos del suelo y las plantas crea un ambiente particular en la rizósfera de las plantas. De hecho lo que ocurre en la rizósfera no sólo es producto de la actividad de la raíz sino también de otros componentes del suelo (ej. microorganismos). Este trabajo se encuentra basado en conocer los posibles efectos involucrados en la combinación de factores como N y pH sobre algunos parámetros de crecimiento en las plantas bajo estudio. Es por ello que se escogió un sistema experimental que aisle de cierto modo a la misma de los microorganismos, de modo que estos no enmascaren su efecto y creen efectos confundidos. De hecho se tuvo que hacer una serie de ensayos preliminares para poner a punto la solución que más se adecue en las plantas modelos.

La tesis posee 5 capítulos, en el presente se realizó una revisión bibliográfica de antecedentes de los distintos factores que afectan el crecimiento, principalmente cuando son suministrados con la forma de N y el pH de crecimiento y sus respuestas para distintas especies. El capítulo 2 se centra en las respuestas de crecimiento obtenidas de las especies de algodón y girasol cuando son sometidas a dos factores, N y pH del medio y sus interacciones. También y como foco principal se estudia el flujo de  $H^+$  en la rizósfera para aquellos tratamientos. Estas dos especies se analizarán en forma conjunta debido a comparten las mismas metodologías de trabajo.

El capítulo 3 describe el efecto de los factores N y pH sobre las variables de crecimiento y flujo de  $H^+$  en plantas de soja. Estos experimentos de soja requieren un mayor número de mediciones que girasol y algodón, por la simple utilización de los nódulos como otra fuente de aporte de N a las plantas.

El capítulo 4 aborda una discusión general que incluye la integración de los resultados de los capítulos previos, incluyendo varios gráficos. Uno de esos gráficos resumen el flujo de  $H^+$  y el crecimiento de las plantas para las tres especies. Finalmente, el capítulo 5 contiene las referencias bibliográficas y un anexo de tablas y gráficos no incluidos en capítulos previos.

## **CAPÍTULO 2:**

### **EFFECTOS DE LAS FUENTES NITROGENADAS Y NIVELES DE pH SOBRE LA LIBERACIÓN DE PROTONES EN LA RIZÓSFERA DEL GIRASOL Y ALGODÓN**

## 2.1 INTRODUCCIÓN

El nutriente del suelo requerido en mayor cantidad por las plantas es el N (Marschner 1995; Rubio *et al.* 2003), cuyas formas disponibles en el suelo son como anión  $\text{NO}_3^-$  y como catión  $\text{NH}_4^+$ . La proporción de ambas formas es variable dependiendo de las propiedades físico-químicas del suelo y de las condiciones ambientales (Miller y Cramer 2004; Fragaria y Stone 2006). Generalmente el  $\text{NO}_3^-$  es el que se halla en mayor proporción en los suelos cultivados. En los suelos no cultivados, fríos, ácidos y anegados predomina el  $\text{NH}_4^+$  (Britto y Kronzucker 2002). Smirnov *et al.* (1984) identificaron familias que se especializan en la absorción de  $\text{NO}_3^-$  como Chenopodeaceae, Rosaceae, Urticaceae y otras en  $\text{NH}_4^+$  como Ericaceae, Pinaceae, Proteaceae, usando como indicador la actividad de la nitrato reductasa.

Cuando la fuente principal en la solución del suelo es  $\text{NH}_4^+$ , la mayoría de las plantas reducen el crecimiento, en algunos casos con síntomas de toxicidad (Chaillou *et al.* 1986; Britto y Kronzucker 2002). Las distintas especies de plantas presentan algún tipo de tolerancia dada por su mayor o menor sensibilidad a esta fuente. Esta sensibilidad cambia durante las diferentes etapas de crecimiento y desarrollo de las plantas (Vollbrecht *et al.* 1989). Por ejemplo Britto y Kronzucker (2002) mencionan que las plantas crecidas en medios predominantemente con la fuente  $\text{NH}_4^+$  producen una serie de síntomas visuales y/o fisiológicos como desbalance iónico y hormonal. Mientras que Schortemeyer *et al.* (1993) observaron cambios en la morfología de la raíz del maíz, cuando el medio contenía  $\text{NH}_4^+$ ; como la asimilación del  $\text{NH}_4^+$  ocurre preferentemente en raíces, el flujo descendente de carbohidratos a través del floema es acompañado por ciertos tipos de fitohormonas, presuntamente responsables de los cambios morfológicos, sostuvieron los autores.

La mayoría de los trabajos, sobre este tema, citan  $\text{NO}_3^-$  como así también al  $\text{NO}_3\text{NH}_4$  como las responsables del mayor crecimiento en plantas cultivadas con estas fuentes nitrogenadas (Vessey *et al.* 1990; Schortemeyer *et al.* 1993). Weissman (1972) determinó que plantas juveniles de girasol y soja cultivadas con la fuente  $\text{NO}_3^-$  producían la mayor acumulación en biomasa que las tratadas con la fuente  $\text{NH}_4^+$ . En plantas de algodón de 22 días Leide *et al.* (1992) encontraron el mayor crecimiento con la fuente  $\text{NO}_3^-$  que con  $\text{NH}_4^+$ . Kirkby y Mengel (1967) en sus experimentos observó un mayor crecimiento, en plantas de tomate juveniles, para la fuente  $\text{NO}_3^-$  que para la fuente  $\text{NH}_4^+$ .

El pH del medio juega un rol fundamental en la absorción de los nutrientes, ya que incide directamente en la solubilidad de ellos, como el N, P, Fe, Mn, Zn, etc. (Marschner 1995). Por ejemplo ensayos desarrollados en hidroponia, los autores observaron que los pH ácidos favorecen la absorción de  $\text{NO}_3^-$  en plantas de soja (Vessey *et al.* 1990) y en maíz (Schortemeyer *et al.* 1993), por el contrario en tomate se verificó que la absorción de  $\text{NO}_3^-$  era menor a pH 4 (Ludewing *et al.* 2002). En *Arabidopsis*, la máxima absorción se dio entre pH 8-9 sobre un rango de 3-10 (Doddema y Telkamp 1979). En *Picea abies*, se verificó la máxima tasa de absorción a pH 5,5 en un rango de 2,5 a 6,5 (Peuke y Tischener 1991). Estos autores atribuyeron que los pH ácidos reducen la actividad de la nitrato reductasa, encargada de reducir el  $\text{NO}_3^-$  a  $\text{NO}_2^-$ . Glass y Siddiqi (1984) señalaron al pH como responsable de la alteración de las cargas de grupos R de los aminoácidos situados en los canales o carriers (de la MP). Con ello, se puede perder la identidad de un determinado flujo de ión, actuando independientemente al flujo de los  $\text{H}^+$  producto de las ATP-asa. En algodón y girasol no se encontró bibliografía de los pH óptimos para la absorción de las distintas fuentes de N.



Los antecedentes indican que el crecimiento de las plantas pueden ser afectado según como tomen o absorban el N del medio. Cuando se incluye al pH de crecimiento, el abanico de respuesta es aún mayor, ya que se puede observar desde efectos simples para los factores principales, o interacciones para las distintas variables analizadas. Incluso en una misma especie, los distintos órganos pueden presentar efectos diferentes. Por ejemplo, Lang y Kaiser (1994) no observaron diferencias en la biomasa aérea en plantas de cebada cultivadas con las fuentes  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NH}_4^+$ , combinadas con los pH de 4,0; 5,5; 6,8. Sin embargo la biomasa radical y la longitud radical resultaron afectadas por la combinación entre la fuente de N y el pH ( $\text{NH}_4^+$  y pH ácido). Por su parte Brix *et al.* (2002) encontraron efecto interactivo entre N y pH en la tasa de crecimiento relativa (TCR) en plantas de *Typha latifolia*; la máxima tasa fue registrada para la combinación de N- $\text{NH}_4^+$  y pH-6,5; las plantas tratadas con la fuente  $\text{NO}_3^-$  el patrón no fue claro. En girasol y en algodón no se encontraron antecedentes que evaluaran el efecto interactivo de N x pH sobre las variables de crecimiento.

La forma en que la planta absorbe el N ( $\text{NO}_3^-$  o  $\text{NH}_4^+$ ), determina en gran medida si las raíces liberarán al medio  $\text{OH}^-$  o  $\text{H}^+$  como consecuencia del equilibrio homeostático celular (Marschner 1995). Si la fuente del medio contiene  $\text{NO}_3^-$ , lo más probable es una alcalinización en la rizósfera; por el contrario si el medio contiene  $\text{NH}_4^+$  debería esperarse una acidificación rizosférica (Nye 1981; Haynes 1990; Raven 1990). Hylander *et al.* (1999) observaron que raíces de algodón acidificaban en mayor proporción que las raíces de maíz, soja y arroz, cuando fueron crecidas en un rizobox con  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  hasta los 90 días. Römheld *et al.* (1984) observaron en plantas de girasol una fuerte acidificación con la fuente  $\text{NH}_4^+$ , y ante situaciones deficitarias de  $\text{Fe}^{++}$ .

La acidificación observada por raíces de las plantas no se debe solo a la absorción diferencial de cationes y aniones, también se la vincula a situaciones de carencia de nutrientes o micronutrientes. Ramani y Kannan (1982) en plantas de algodón y Cakmak y Marschner (1990) en plantas de algodón y girasol observaron una fuerte acidificación al medio cuando estas fueron crecidas en condiciones deficitarias de Zn. Esto era consecuencia de que la raíz reducía la entrada de  $\text{NO}_3^-$ , pero incrementaba la absorción de cationes. Wang *et al.* (2008) menciona que las plantas de algodón no tienen la capacidad de modificar la química de la rizósfera y acceder a nutrientes pocos móviles y lábiles, ejemplo el P; distinto a lo que experimentaban otras especies, como lupino con la liberación de ácidos carboxílicos al medio. Faggioli (2008) observó que raíces de girasol, acidificaban en una magnitud mayor que raíces de maíz y soja, independientemente de la oferta de P, tanto en medios hidropónicos como en macetas. Alcantara y De la Guardia (1994) observaron que ciertos genotipos de girasol presentaban una alta tasa de acidificación cuando el medio era deficitario de  $\text{Fe}^{++}$  en relación a otro grupo de menor acidificación. Sin embargo estos dos grupos accedían a distintas fracciones de  $\text{Fe}^{++}$  mediante otros mecanismos que no era la liberación de  $\text{H}^+$ , concluyeron los autores. Römheld *et al.* (1984) observaron que plantas de girasol producían una acidificación cuando el medio presentaba una baja concentración  $\text{Fe}^{++}$ , presencia de fusicoccin (toxina producida por un hongo) en la solución, o el medio de crecimiento conteniendo  $\text{NH}_4^+$  como única fuente de N. Todas estas situaciones inducían a las ATP-asa a una liberación de  $\text{H}^+$ .

La acidificación rizosférica originaría de los exudados radicales puede provenir de ácidos orgánicos o de  $\text{H}^+$ . Estos últimos provienen, en parte, de la bomba ATP-asa localizada en las membranas de las células radicales. Estas bombas ATP-asa actúan suministrando la fuerza necesaria para la absorción de los nutrientes, creando un

gradiente electroquímico y despolarizando a la MP de raíces con la consiguiente entrada de nutrientes (Palmgren y Harper 1999).

El girasol pareciera presentar una fuerte acidificación al medio como destacaron Römheld *et al.* (1984) y Faggioli (2008), tal vez sea un carácter intrínseco de la planta; algodón por su parte la acidificación no parecería ser importante desde el punto de vista de accesibilidad a los nutrientes. Wang *et al.* (2008) detectó que plantas de algodón no produjeron cambios químicos en la rizósfera, ya sea con una liberación de  $H^+$  o de ácidos carboxílicos, ante situaciones de estrés de P; sin embargo mostro capacidad para modificar el crecimiento radical ante falta de P.

A nivel rizósfera se observó que el pH del medio influye en el flujo de  $H^+$  al medio. Esto fue observado por Schubert *et al.* (1990) en *Vicia faba*, cuando la solución de crecimiento se mantuvo a un pH 6 y las plantas respondían con una acidificación. Por el contrario, cuando la solución estaba por debajo del pH 4 o 5 alcalinizaba el medio. Youssef y Chino (1989) observaron en especies de cebada y soja que la liberación de  $H^+$  u  $OH^-$  al medio era dependiente del pH, pero independiente de la fuente de N absorbida. Chaignon *et al.* (2002) en raíces de colza y tomate observaron cambios significativos en el pH de la rizósfera con reducciones de este para suelos calcáreos, e incrementos del pH rizosférico para suelos ácidos. Hawkins y Robbins (2010) observaron que en soja y en *Pinus contorta* exhibían una liberación de  $H^+$  a pH 7 mientras que a pH 4 existía una absorción de  $H^+$ . Los procesos que se dan en las raíces como consecuencia del pH del medio, no están del todo dilucidados y son pocos conocidos los mecanismos que intervienen fisiológicamente.

No se encontró bibliografía específica en algodón y girasol que describa la interacción entre la fuente de N y el pH del medio para variables de crecimiento ni mediciones *in situ* a nivel flujo de  $H^+$  en la rizósfera. Es probable que el flujo de  $H^+$ , de estas dos especies tendrían que responder principalmente al pH del medio, similar a lo encontrado en plantas de soja como halló Hawkins y Robbins (2010), ya que no son especies que hayan sido mejoradas en ese sentido, como fue experimentado en maíz por Yan *et al.* (1998)

### 2.1.2 Objetivos e Hipótesis

El objetivo del capítulo fue evaluar el efecto combinado de la fuente de N y el pH del medio sobre parámetros de crecimiento, morfología radical, contenido de N y la acidificación en la rizósfera de plantas de algodón y girasol. Las hipótesis que se pondrán a prueba son:

1. Existe interacción entre los factores fuente de N y pH del medio al menos para alguna de las variables de crecimiento, morfología radical y contenido de N.
2. Las raíces de las plantas de algodón y girasol que crecen en medios ácidos producen una alcalinización rizosférica, por el contrario en medios alcalinos acidifican la rizósfera.

## 2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.2.1 Material vegetal

Las plantas utilizadas fueron algodón (Guazuncho 3) y girasol (Paraíso 20). La elección del material de algodón se hizo por ser una variedad convencional y de reciente aparición en el mercado superando a su antecesora Guazuncho 2. La variedad

Guazuncho 3 se caracteriza por poseer una buena calidad de fibra (longitud, microoner y resistencia de las fibras). Además cuenta con valores altos de la relación fibra/semilla, característica importante en la cadena hilandera del algodón. En el caso de girasol se utilizó el híbrido Paraíso 20, por tener un buen rendimiento en bruto y un alto contenido de aceite en semilla.

### 2.2.2 Condiciones experimentales

El ensayo tuvo lugar en el invernáculo de la Facultad de Agronomía de la UBA y las determinaciones posteriores fueron realizadas en la Cátedra de Fertilidad y Fertilizantes de dicha Facultad. El fotoperiodo aplicado fue de 14 hs de luz durante el crecimiento. El invernáculo contó con lámparas halógenas las cuales se encendían cuando el fotoperiodo estaba por debajo de ese umbral. El cultivo de algodón es insensible al fotoperiodo en todo su ciclo, por el contrario responde principalmente a las temperaturas y por arriba de su base de 15,5 °C (Lomas *et al.* 1977; Young *et al.* 1980). En tanto el girasol responde al fotoperiodo a partir del inicio de floración, mientras que en etapas juveniles es insensible al mismo (Andrade y Sadras 2002). El invernáculo también contó con un sistema de calefacción y refrigeración, regulados por sensores automáticos, y las temperaturas mínimas y máximas estuvieron comprendidas entre los 20° y 38 °C respectivamente para el óptimo crecimiento de las plantas.

El sustrato donde crecieron las plantas fueron soluciones hidropónicas. Este sistema permite independizarse de algunas interacciones como suelo-microorganismos y de este modo resaltar el efecto de los tratamientos sobre la rizósfera de las raíces y el crecimiento de la planta. Muchos experimentos son llevados a cabo en hidroponía durante todo el ciclo de vida de una planta, cuyos resultados son similares a los desarrollados a campo, ya que provee los nutrientes necesarios para el crecimiento. La hidroponía es un medio donde los nutrientes están disponibles en forma inmediata, soluble y muchas veces en exceso, lo cual hacen de un medio de crecimiento similar o hasta mayor a lo observado a campo. En el caso del presente experimento, se utilizó hidroponía para individualizar los efectos simples y las interacciones entre los factores expuestos. En posteriores etapas del presente plan se podrán explorar otras condiciones experimentales, en base a los resultados que surgen de la presente.

Se utilizaron bateas de 25 l de capacidad (22 cm ancho por 45 cm largo y 25 cm profundidad) para el pretratamiento y de 12 l (22 cm ancho por 21 cm largo y 25 cm profundidad) para el tratamiento. Cada solución fue oxigenada a través de una bomba de aireación para peceras.

**Germinación:** Las semillas de algodón y girasol fueron esterilizadas con una solución al 10 % (v/v) de NaHOCl comercial (hipoclorito de sodio), durante 3 minutos y luego enjuagadas con agua destilada. Posteriormente fueron colocadas en papel secante y envueltas de modo de formar unos cilindros que permanecieron húmedos en una solución de  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  (0,8 mM) y mantenidas a 25-28° C durante 6 días. La figura 2.2.1 muestra las etapas y duración (en días) del ensayo.

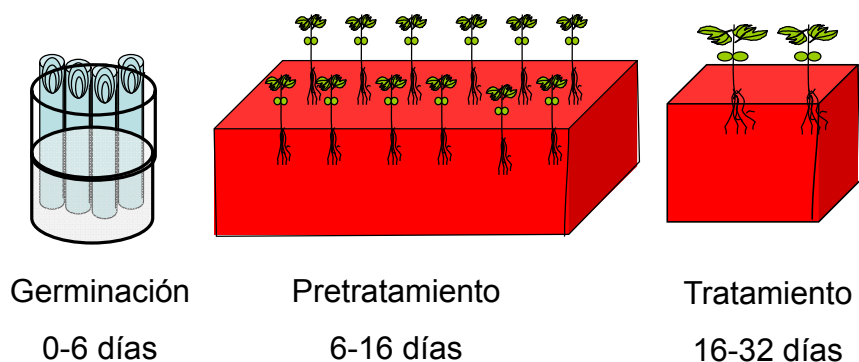


Figura 2.2.1. Etapas y duración en días del experimento: germinación, pretratamiento y tratamiento.

*Pretratamiento*: posterior a la etapa de germinación, las plántulas fueron seleccionadas de acuerdo a su estado de desarrollo y con tamaños similares para ser llevadas a una etapa de pretratamiento. La duración de esta etapa fue de 10 días. Las plántulas seleccionadas fueron colocadas en planchas de tergopol sobre las bateas. Las planchas de tergopol sirvieron de sostén de las plantas, a modo de tapa, evitando la evaporación e impidiendo la entrada de luz (Figura 2.2.1). Estas presentaban 12 orificios donde se alojaban las plantas sostenidas por un listón de guata en la base del tallo. La composición de la solución con los macronutrientes es presentada en la tabla 2.2.1; los micronutrientes fueron los siguientes expresados en  $\mu\text{mol/l}$ :  $\text{KH}_2\text{PO}_3$  0,1; Fe EDTA 5,0;  $\text{MnSO}_4$  4,6;  $\text{H}_3\text{BO}_3$  23;  $\text{CuSO}_4$  1,6;  $\text{MoO}_3$  1,0;  $\text{Co Cl}_2$  1,0.

Tabla 2.2.1. Composición química de las soluciones nutritivas para el pretratamiento y tratamiento y las distintas formas de N suministradas.

Sales o compuestos	Solución del pretratamiento	Soluciones de los tratamientos		
	$\text{NH}_4\text{NO}_3$	$\text{NH}_4\text{NO}_3$	$\text{NO}_3^-$	$\text{NH}_4^+$
	$\text{mmol l}^{-1}$		$\text{mmol l}^{-1}$	
$\text{KNO}_3$			2,5	
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$			1,5	
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$				2,75
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	2,75	2,75		
$\text{Ca Cl}_2$	1,5	1,5	1,5	2,5
$\text{Mg SO}_4$	0,5	0,5	1,0	1,0
$\text{K CL}$				2,5
$\text{K}_2\text{SO}_4$	1,5	1,5	1,0	
$\text{Mg CL}_2$	0,025	0,025		

El pH de la solución se lo mantuvo en un rango de 5,9 y 6,1 con el agregado de álcali (KOH) o ácido clorhídrico (HCl). El cambio de solución nutritiva se realizó a los 6 días para evitar el agotamiento de la solución nutritiva o su distorsión por los posibles compuestos exudados de las plantas. El agua de las soluciones fue desmineralizada obtenidas a través de un equipo de filtración de agua (Columnas: Deionex modelo MC-160). La distribución de las bateas fue completamente al azar, que fueron rotadas al realizarse el cambio de solución.

*Tratamientos:* Las plantas del pretratamiento fueron seleccionadas por similar estado de crecimiento y llevadas a las bateas (12 l) de tratamientos (Figura 2.2.1). Las bateas presentaban tapas de plástico con 2 perforaciones donde fueron alojadas las plantas y sostenidas por un listón de guata en la base del tallo.

Se utilizó para cada especie un diseño factorial en bloques aleatorizados y cuatro repeticiones. Los factores principales fueron las formas de N y niveles de pH, y cada factor contó con tres niveles. Para el factor N, las fuentes fueron suministradas como  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{NO}_3^-$ , y llevadas cada fuente a los siguientes pH 4,5; 6,0 y 7,5. Los bloques se basaron en fechas de siembra consecutivas (2 para cada especie), realizadas a intervalos de dos días entre las fechas. Las mediciones de liberación de  $\text{H}^+$  se hizo entre las 11 am y 16 pm, debido a que registros previos dieron las mayores tasas de liberación de  $\text{H}^+$ .

Las fuentes de N de las soluciones tratamiento tuvieron como base la utilizada por Faggioli (2008) pero presentando modificaciones con respecto a las fuentes de N (Tabla 2.2.1).

La concentración total de N suministrada fue de 5,5 mM para las 3 fuentes (Tabla 2.2.1). Los micronutrientes utilizados fueron los mismos que para el pretratamiento.

La duración del tratamiento fue de 16 días, correspondiente a 32 DDS.

### 2.2.3 Determinaciones:

*pH de las soluciones y liberación de  $\text{H}^+$ :* el pH en la etapa de pretratamiento y tratamiento fueron mantenidos en los rangos establecidos con el agregado de hidróxido de sodio (0,5 y 4 M) o ácido sulfúrico (0,1 y 0,5 M). Se utilizó un pH metro marca Orion 410 tanto en las mediciones de las bateas de 25 l y 12 l. Este mismo aparato fue utilizado en las mediciones de liberación de  $\text{H}^+$  en los tubos de ensayos.

*Cosecha y medición de biomasa seca:* a los 16 días del tratamiento (32 DDS) se procedió a la cosecha de las plantas, separando en parte aérea (hoja y tallo) y raíz. Estas fueron colocadas en estufas a 70°C durante 3 días para su posterior peso seco, excepto la raíz. Esta última fue frizada para su posterior determinación de los parámetros de morfología radical.

*Determinación de N:* el nitrógeno total se obtuvo multiplicando la biomasa total seca por la concentración de N en planta, este último se determinó a través del método modificado de Kjeldahl (Baethgen y Alley 1989).

*Morfología Radical:* las raíces previamente frizadas, se las descongeló y luego se las pasó por un escáner para determinar el área radical total (ART) área específica radical (AER), longitud radical total (LRT), longitud específica radical (LER) y diámetro radical promedio, mediante el programa Winrhizo (versión 2008).

*Tasa de liberación de  $\text{H}^+$ :* A los 16 días de tratamiento, previo a la disección de las plantas, se les determinó el flujo de  $\text{H}^+$  en la rizósfera de las raíces, individuales, vivas y activas, sin ser cortadas de la planta madre (Henriksen *et al.* 1992). Para ello se ideó un sistema compuesto de dos recipientes de tamaño diferentes y 3 tubos de ensayos

intercalados entre estos dos recipientes (Figura 2.2.2). El recipiente menor de 6 cm de diámetro por 10 cm de alto, contenía a la planta seleccionada con sus raíces sumergida en la solución de origen. El recipiente mayor, de 11cm de diámetro por 15 cm de alto, alojaba al recipiente menor además de una serie de tubos de ensayos (Figura 2.2.2). El recipiente mayor en su parte superior contaba con una tapa y un orificio de salida para la parte aérea de la planta, quedando las raíces completamente tapadas, similar a una maceta. Las mediciones de liberación de  $H^+$  se hicieron en raíces de segundo orden, previamente lavadas con agua destilada e insertas en los tubos de ensayos. Estas raíces fueron manipuladas con cuidado para no producir corte ni lesión. Los tubos de ensayos, con una capacidad de 15 ml, contenía una solución con agua destilada más  $CaCl_2$  (0,08 mmol) y llevada al pH del tratamiento a que fue cultivada la planta. Este sistema fue puesto en un agitador electrónico, con un movimiento oscilante de 60 rpm y durante 30 minutos por planta para mantener una oxigenación en las raíces. Posteriormente se procedió al corte de la raíz contenida en el tubo de ensayo, solo en la porción que se encontraba en contacto con la solución. Luego era extraída y secada con papel tissue y pesada para obtener el peso fresco. En el líquido remanente del tubo de ensayo (una vez extraída la raíz) se le determinaba el pH final. Para el cálculo del flujo  $H^+$  en los tubos de ensayo se registraba los valores de pH inicial y final, luego mediante una transformación logarítmica de esos valores y con los pesos fresco de raíz en mg (miligramos) y el tiempo de agitación se obtenía el flujo de  $H^+$  en  $\mu mol\ g^{-1}$  peso fresco (PF) de raíz  $h^{-1}$  por hora en la rizósfera.



Figura 2.2.2 Medición de liberación de  $H^+$ . Sistema de recipientes y tubos de ensayos para medición de  $H^+$  en la rizósfera de las raíces de las plantas.

### 2.2.4 Análisis estadístico

Los datos recolectados fueron analizados mediante un ANOVA, y las diferencias entre medias se determinaron con el Test de Tukey ( $p < 0.05$ ). La variable liberación de  $H^+$  fue transformada a variable rango, ya que no cumplía con los supuestos. Para esta misma variable y solo en los pH 6,0 y 7,0 se utilizó el test de “t” para verificar si realmente hubo una liberación de  $H^+$ . El programa utilizado fue Infostat/Profesional versión 1.1

## 2.3 RESULTADOS

### Especie: Girasol

#### 2.3.1. Parámetros del crecimiento

El crecimiento de las plantas de girasol fue afectado principalmente por la forma de N suministrada ( $p < 0,001$ ); por el contrario el factor pH no incidió en el crecimiento como tampoco la interacción entre ambos factores (Figura 2.3.1). Las plantas de girasol alcanzaron la mayor biomasa total, aérea y radical cuando fueron cultivadas con  $NH_4NO_3$  y  $NO_3^-$ , sin diferencias estadísticas entre ellas. Las plantas con la fuente  $NH_4^+$  presentaron el menor crecimiento, diferenciándose de aquellas dos últimas. La biomasa total, aérea y radical de las plantas que crecieron con la fuente  $NH_4^+$  produjo el 40% en relación a las plantas con  $NH_4NO_3$  (Figura 2.3.1). Esta reducción en iguales proporciones ocasionó que la relación raíz-tallo se mantuviera estable y no fuese afectada por los factores principales ni por la interacción (Tabla 2.3.1).

Tabla 2.3.1 Valores de “p” para variables de biomasa total, aérea, radical y relación raíz-tallo cuando son tratados con las fuente de N y niveles de pH y su interacción N x pH en plantas de girasol de 32 DDS. Tabla 2.3.1 Valores de “p” para variables de biomasa total, aérea, radical y relación raíz-tallo cuando son tratados con las fuente de N y niveles de pH y su interacción N x pH en plantas de girasol de 32 DDS.

Variables	Factores		Interacción
	Fuente N	pH	N x pH
Biomasa total	0,0001**	0,5185	0,9230
Biomasa aérea	0,0001**	0,3768	0,8754
Biomasa radical	0,0001**	0,5893	0,8927
Raíz/Tallo	0,7187	0,1709	0,9149

Niveles de significancia:  $p < 0,05$  (\*);  $p < 0,01$  (\*\*);  $p > 0,05$  (ns)

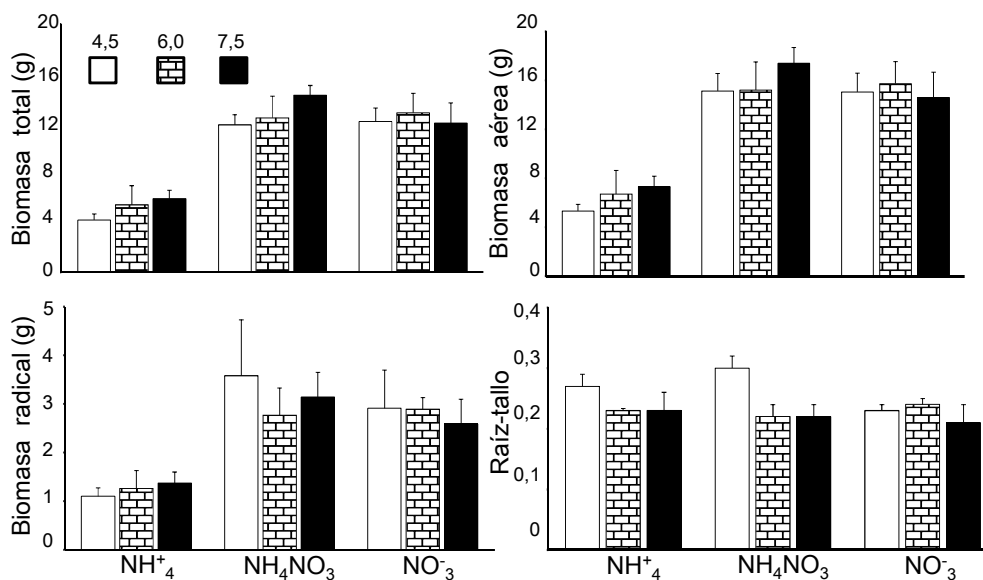


Figura 2.3.1. Parámetros de crecimiento: biomasa total, biomasa aérea, biomasa radical, expresados en (g) y la relación raíz-tallo para plantas de girasol, para los tratamientos con fuentes de N y niveles de pH del medio a los 32 DDS. Las barras indica el error estándar de las medias. Letras iguales no difieren entre si y  $a < b < c$ .

### 2.3.2 Morfología radical

La morfología radical fue afectada por los tratamientos. La longitud radical total (LRT) presento diferencia por fuente de N (Tabla 2.3.2). Las plantas cuando crecieron con la fuente  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  experimentaron las máximas longitudes de raíces con valores promedio de 110 m raíz planta<sup>-1</sup>. Esta fue seguida y sin diferencias estadísticas por las raíces tratadas con  $\text{NH}_4^+$ , con 65 m raíz planta<sup>-1</sup>, por el contrario las plantas que crecieron con  $\text{NO}_3^-$  produjeron 35 m raíz planta<sup>-1</sup> diferenciándose estadísticamente solo de aquellas plantas tratadas con  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (Figura 2.3.2).

La longitud específica radical (LER), es una medida de eficiencia radical e indica la cantidad de m de raíz producida por g de raíz invertida. Para esta variable las raíces presentaron diferencia por la forma de N y el pH del medio (Tabla 2.3.2). Las más eficientes resultaron las raíces cultivadas con  $\text{NH}_4^+$  (55 m g raíz<sup>-1</sup>), seguidas por  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  y  $\text{NO}_3^-$  con 31 y 12 m g raíz<sup>-1</sup> respectivamente (Figura 2.3.2). Los medios de pH ácidos resultaron favorables para el crecimiento en longitud ya que produjeron 42 m por g raíz, mientras cuando el medio incrementó de pH (6,0 y 7,5) tendieron a una



disminución del 20% y 40% respectivamente. Solo ofrecieron diferencia significativa los dos pH extremos.

Por su parte el área radical total (ART) presento interacción entre los factores principales (Tabla 2.3.1). Esta variable también de importancia desde el punto de vista de captura de recursos, ya que indica la superficie radical total que está en contacto con el suelo. Las raíces que originaron la mayor superficie fue cuando se combino la fuente  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  y el pH 4,5 con  $1400 \text{ cm}^2 \text{ planta}^{-1}$  (Figura 2.3.3). Este valor máximo registrado en parte se debió a su biomasa radical. Esta misma fuente a los pH 6,0 y 7,5 se redujo en un 50 y 60 % la superficie respectivamente.

El área específica radical (AER), otra medida de eficiencia, fue afectada únicamente por la fuente de N. Las plantas que crecieron con  $\text{NH}_4^+$  resultaron en producir  $350 \text{ cm}^2 \text{ por g raíz}^{-1}$ , sin diferencias estadísticas de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  que se redujo en un 30%. Cuando fueron cultivadas con  $\text{NO}_3^-$  redujeron un 60% significativamente diferente de los otros dos tratamientos (Figura 2.3.2).

La fuente de N también afecto el diámetro radical promedio en una relación inversa al AER (Tabla 2.3.2 y Fig. 2.3.2) ya que raíces de mayor diámetro fueron las tratadas con  $\text{NO}_3^-$  (0,36 mm), seguidas por  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  y  $\text{NH}_4^+$  con valores de 0,27 y 0,20 mm respectivamente.

Tabla 2.3.2 Valores de “p” para variables de longitud radical total, longitud específica radical, área radical total, área específica radical y diámetro promedio radical, cuando son tratados con las fuente de N y niveles de pH y su interacción N x pH en plantas de girasol de 32 DDS.

Variables	Factores		Interacción
	Fuente N	pH	N x pH
Longitud radical total-LRT-	0,0032**	0,1062	0,5912
Longitud específica radical-LER-	0,0001**	0,0451*	0,2584
Área radical total-ART-	0,0001**	0,0092**	0,0140*
Área específica radical-AER-	0,0001**	0,0582	0,0873
Diámetro radical promedio-DRP-	0,0002**	0,9989	0,5622

Niveles de significancia:  $p < 0,05$  (\*);  $p < 0,01$  (\*\*);  $p > 0,05$  (ns)

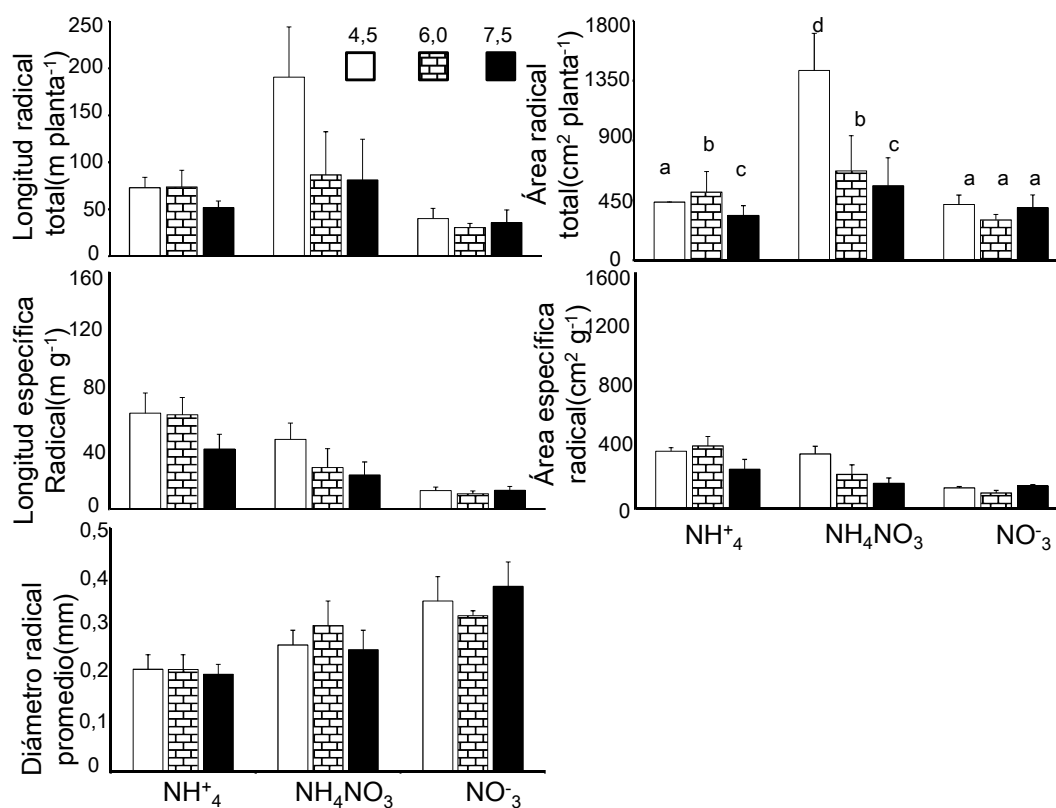


Figura 2.3.2. Morfología radical de las plantas de girasol: longitud radical total(LRT), longitud específica radical (LER), área radical total(ART), área específica radical(AER), y diámetro radical promedio para los tratamientos de fuente de N y niveles de pH, evaluadas a los 32 DDS. Tratamientos con la misma letra no difieren significativamente con un  $p < 0,05$  y donde  $a < b < c$ . Las barras representan el error estándar de las medias.

### 2.3.3 Concentración de N.

La concentración de N ( $\mu\text{g}$  de N  $\text{mg}^{-1}$ ) en planta presentó interacción significativa entre los factores N y pH ( $p < 0,01^{**}$ ) Fig. 2.3.3. Esta interacción se originó con una respuesta contrastantes entre dos de las fuentes utilizadas,  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{NO}_3^-$ , y solo al pH 7,5. A este nivel de pH, las plantas que concentraron mayor N en sus tejidos fueron las crecidas con  $\text{NH}_4^+$  ( $70 \mu\text{g}$  de N  $\text{mg}^{-1}$ ), por el contrario las de menor concentración y estadísticamente diferentes fueron las crecidas con  $\text{NO}_3^-$  ( $50 \mu\text{g}$  de N  $\text{mg}^{-1}$ ) (Fig. 2.3.3). Los restantes tratamientos, que incluyen a las plantas con  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{NO}_3^-$  a los pH 4,5 y 6,0 y plantas con la fuente  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  en todos sus rangos de pH, se mantuvieron en valores intermedios de los dos primeros tratamientos ( $60 \mu\text{g}$  de N  $\text{mg}^{-1}$ )

El contenido de N total presentó el mismo comportamiento a la biomasa total, diferencias significativas por la forma de N. Las plantas que crecieron con  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  y  $\text{NO}_3^-$  fueron las que acumularon más N total en sus tejidos con 974 y 887  $\text{mg}$  de N  $\text{planta}^{-1}$  respectivamente (Fig. 2.3.3). Por el contrario las plantas con  $\text{NH}_4^+$  fueron las que acumularon menos N total en sus tejidos diferenciándose estadísticamente de las dos anteriores ( $413 \text{ mg}$  de N  $\text{planta}^{-1}$ ).

Tabla 2.3.3 Valores de “p” para Concentración de N y N total en plantas de girasol, cuando son tratados por los factores fuente de N y niveles de pH, y su interacción, a los 32 DDS.

Variables	Factores		Interacción
	Fuente N	pH	N x pH
Concentración de N	0,0421*	0,9970	0,0081**
N total	0,0001* *	0,8383	0,3227

Niveles de significancia:  $p < 0.05$  (\*);  $p < 0.01$  (\*\*);  $p > 0.05$  (ns)

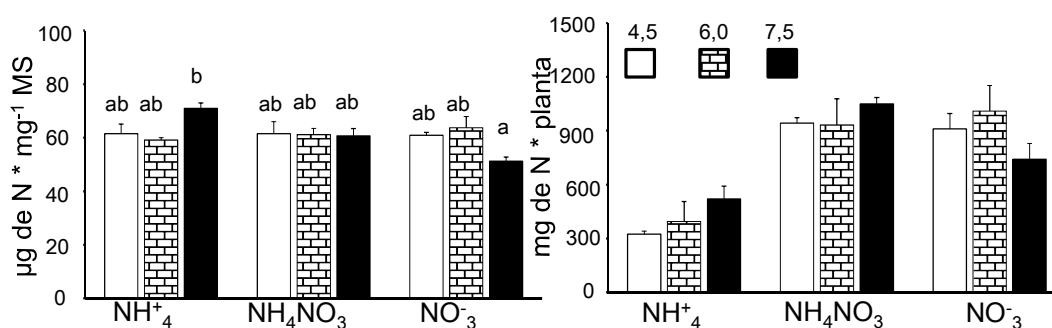


Figura 2.3.3. Concentración de N ( $\mu\text{g}$  de N  $\text{mg}^{-1}$  de PS vegetal o M.S) y contenido total de N ( $\text{mg}$  de N por planta) en plantas de girasol de 32 DDS, bajo diferentes tratamientos de fuente de N y niveles de pH. Tratamientos con la misma letra no difieren entre sí, donde  $a < b < c$ ; Significancia  $p < 0,05$  \*. Las barras indican el error estándar de la media.

### 2.3.4 Liberación de H<sup>+</sup>

La variable liberación de H<sup>+</sup> presentó una respuesta diferente con respecto a las variables de crecimiento, ya que no fue afectada por la forma de N, en cambio fue afectada por el factor pH ( $p=0,0001^{**}$ ) (Figura 2.3.4). Las raíces de girasol presentaron una fuerte alcalinización al medio con el pH más bajo (respuesta negativa) mientras que en las otras dos condiciones la respuesta fue mucho menor y tendiente a una liberación de H<sup>+</sup>. En medio ácido (pH 4,5) independientemente de las formas de N las raíces alcalinizaron la rizósfera con un valor promedio de  $-307 \mu\text{mol g}^{-1}\text{PF h}^{-1}$ . Esta se diferenció estadísticamente de las raíces que crecieron a pH medios (6,0) y altos (7,5), que acidificaron o produjeron una alcalinización al medio con valores de 60 y  $15 \mu\text{mol g}^{-1}\text{PF h}^{-1}$  de H<sup>+</sup> respectivamente.

Los pH 6,0 a 7,5 fue difícil establecer si hubo un flujo de H<sup>+</sup> diferente de cero y para ellos se hizo una prueba de ("t"), indicando que todos los tratamientos a esos pH acidificaron el medio ( $p<0,01^{**}$ ).

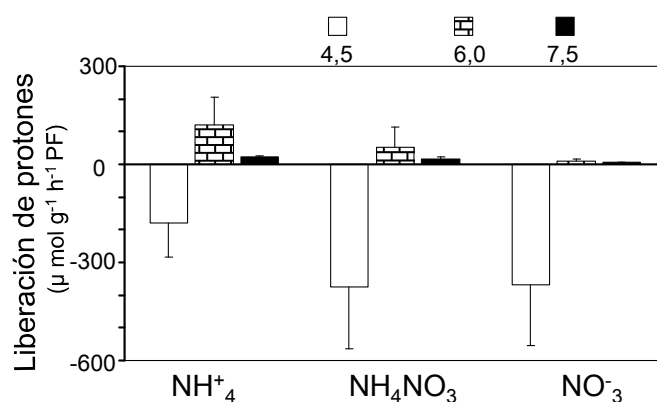


Figura 2.3.4 Efecto de las fuentes de N y los niveles de pH sobre la liberación de H<sup>+</sup> expresados en  $\mu\text{mol de H}^+ \text{g}^{-1}\text{PF h}^{-1}$  para el girasol de 32 DDS. Las barras con valores por debajo de cero (-) o por arriba el cero (+) indicarían una alcalinización o una acidificación al medio respectivamente. Las barras indican el error estándar de las medias.

## Especie: Algodón

### 2.3.5 Parámetros del crecimiento

Las variables de crecimiento fueron afectadas significativamente por el factor fuente de N (Tabla 2.3.3). A las plantas de algodón les resultó igual crecer con los tratamientos  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  o  $\text{NO}_3^-$ , ya que es donde expresaron la máxima biomasa total con 6,36 g y 6,26 g respectivamente y sin diferencias entre ellas. Por el contrario cuando crecieron con la fuente  $\text{NH}_4^+$  redujeron el crecimiento en un 40% (3,94 g) diferenciándose de las dos anteriores.

La biomasa aérea presentó la misma tendencia que la biomasa total, se diferenció por el factor N (Tabla 2.3.3 y Figura 2.3.5). Las plantas tratadas con  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  y  $\text{NO}_3^-$  produjeron los máximos pesos con 5,58 y 5,50 g respectivamente, mientras que aquellas plantas con la fuente  $\text{NH}_4^+$  redujeron el crecimiento en un 40% -3,32 g-(Fig. 2.3.5), diferenciándose de las dos primeras.

La biomasa radical fue afectada por la fuente de N, presentando los mayores pesos de raíces aquellas plantas tratadas con  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (0,77 g) y  $\text{NO}_3^-$  (0,76 g) sin diferencias entre ellas. Las plantas que crecieron con  $\text{NH}_4^+$  redujeron el crecimiento en un 20%, sin diferenciarse de las raíces con las fuentes  $\text{NO}_3^-$ , pero sí de aquellas raíces creciendo en  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (Figura 2.3.5).

La relación raíz-tallo fue afectada por la interacción entre los factores principales. La combinación entre la fuente  $\text{NH}_4^+$  y el pH 6,0 originaron plantas con la máxima relación raíz-tallo de 0,26. Para esta fuente los pH 4,5 y 7,5 no se diferenciaron ya que se redujeron en un 30% en ambos casos. Mientras  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  y  $\text{NO}_3^-$  en todos los rangos de pH se redujó un 65% aproximadamente del tratamiento que obtuvo el máximo valor.

Tabla 2.3.4 Valores de “p” para biomasa total, aérea, radical y relación raíz-tallo (R/T) cuando son tratados con las fuente de N y niveles de pH y su interacción N x pH en plantas de algodón de 32 DDS.

Variables	Factores		Interacción
	Fuente N	pH	N x pH
Biomasa total	0,0011**	0,7013	0,4033
Biomasa aérea	0,0009**	0,6717	0,3366
Biomasa radical	0,0451*	0,6831	0,9655
Raíz/Tallo	0,0005**	0,2709	0,0348*

Niveles de significancia:  $p < 0,05$  (\*);  $p < 0,01$  (\*\*);  $p > 0,05$  (ns)

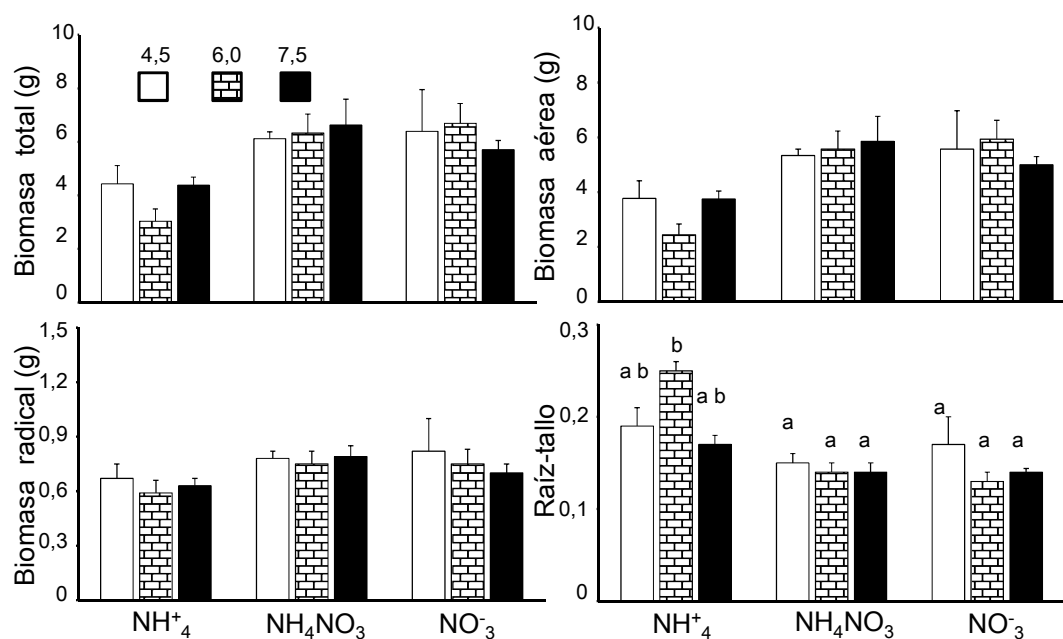


Figura 2.3.5. Parámetros de crecimiento: biomasa total, biomasa aérea, biomasa radical, expresados en (g) y la relación raíz-tallo para plantas de algodón de 32 DDS, tratadas con las distintas fuentes de N y niveles de pH del medio. Tratamientos con la misma letra no difieren significativamente con un  $p < 0,05$  para la interacción y  $a < b < c$ . Las barras indica el error estándar de las medias

### 2.3.6 Concentración de N y morfología radical.

La concentración de N ( $\mu\text{mol de N mg}^{-1}$ ) en plantas de algodón no mostró diferencias significativas por los factores principales ni por su interacción. La cantidad de N total en planta fue afectada por la fuente de N ( $p < 0,05$ ): las plantas que acumularon mayor N total fueron aquellas con las formas de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (455 mg N) y  $\text{NO}_3^-$  (323 mg N), sin diferencias entre ellas. Con la fuente de  $\text{NH}_4^+$  las plantas redujeron el N total a 270 mg N y con diferencias significativas con respecto a las dos anteriores (Anexo: Figura A1).

Al analizar la LER, LRT, AER, ATR y diámetro radical promedio, no se observaron diferencias significativas para los factores principales ni para sus interacciones (Anexo Tabla 1; Figura A 2). Estas variables presentaron los máximos valores para la fuente  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ .

### 2.3.7. Liberación de $\text{H}^+$

El patrón de respuesta fue similar que en plantas de girasol: efecto significativo del factor pH ( $p: 0,0001$ ) y no significativo para el factor N y su interacción. Cuando el medio de crecimiento estuvo al pH 4,5 las raíces tendieron a producir una absorción de  $\text{H}^+$  o liberación de  $\text{OH}^-$ , observándose una fuerte alcalinización a la rizósfera. Por el contrario este patrón se reinvertió, cuando el medio estuvo a los pH más altos (6,0 y 7,5) con una acidificaron a nivel rizósfera. Sin embargo no en todos los casos se observó una acidificación, solo para las fuente  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  en el pH 6,0 el resto no fueron diferentes de cero.

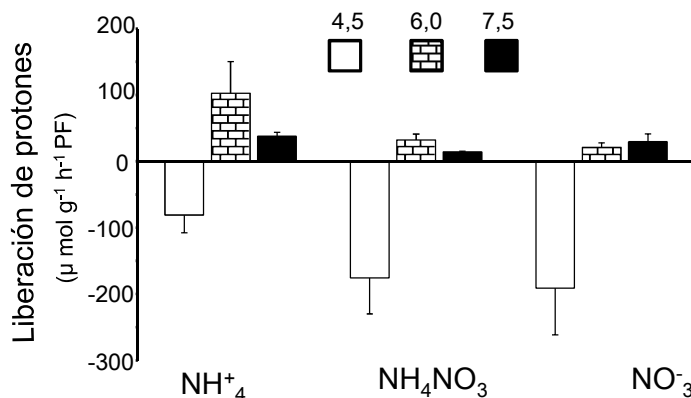


Figura 2.3.6. Efecto de las fuentes de N y los niveles de pH sobre la liberación de  $\text{H}^+$  expresados en  $\mu\text{mol g}^{-1}\text{PF h}^{-1}$  para plantas de algodón a los 32 días de crecimiento. Valores negativos (-) indican una alcalinización al medio y positivos (+) una acidificación. Las barras indican el error estándar de las medias.

## 2.4 DISCUSIÓN

Las plantas de girasol y algodón presentaron respuestas similares a los tratamientos efectuados. Estas fueron puestas de manifiesto en parámetros relacionados al crecimiento y a la tasa de liberación de  $H^+$  al medio.

Los parámetros de crecimiento en las dos especies fueron afectadas por la fuente de N suministrada pero no por el pH del medio. Las plantas de girasol y algodón expresaron el máximo crecimiento con las formas de N como  $NH_4NO_3$  y  $NO_3^-$  ya que acumularon la mayor biomasa total, aérea y radical. Por el contrario, estas dos especies disminuyeron significativamente su crecimiento frente a la fuente  $NH_4^+$ . Estos resultados están en línea con trabajos previos que detectaron la menor viabilidad del  $NH_4^+$  como fuente de N, relacionada con efectos tóxicos y con la dinámica particular del  $NH_4^+$  en las membranas celulares (Britto *et al.* 2001; Ludewig *et al.* 2002; Chen *et al.* 2013). Estos datos concuerdan con los encontrados con Leidi *et al.* (1992) quienes observaron en plantas de algodón de 28 DDS, reducciones del 44% con la fuente de  $NH_4^+$  con respecto a la de  $NO_3^-$ . Imsande (1986) en plantas de soja tratados con la fuente  $NH_4^+$  observó reducción de 8%, Woolhousean y Hardwick (1966) en tomate del 22%, Kirkby y Mengel (1967) también en plantas de tomate reducciones del 65% con respecto a la fuente de  $NO_3^-$  todas ellas llevadas a cabo en hidroponía. Britto y Kronzucker (2006) y Chen *et al.* (2013) en plantas de arroz detectaron un flujo importante de  $NH_4^+$  sobre la MP, ya que observaron una salida del 80% de lo que ingresaba, con lo cual la acumulación de N fue baja en los tejidos. En estas dos especies (algodón y girasol) no se determinó el flujo de  $NH_4^+$  pero posiblemente sucedería algo similar con esta fuente de N.

Con la fuente  $NH_4^+$  las raíces del girasol experimentaron una reducción mayor (-40%) que las de algodón (-20%) con respecto a  $NO_3NH_4$ . Leidi *et al.* (1992) en raíces de algodón valores similares de reducción fueron detectada para esta fuente con respecto al  $NO_3^-$ . Carmi y Shalhevel (1983) destacan que la biomasa radical de algodón, experimenta una menor reducción que la biomasa aérea ante situaciones de estrés. En girasol, la fuente  $NH_4^+$  no modificó la relación R/T debido a que sufrió reducciones en igual proporción en la parte aérea y en la radical. Los valores encontrados para girasol concuerdan con lo observado por Fernandez (2010), trabajando en macetas y tratadas a concentraciones óptimas y subóptimas para P. En algodón, el patrón de la R/T no es claro debido a que solo el tratamiento combinado  $NH_4^+$  y pH 6,0 se destacó del resto, con valores superiores a los otros tratamientos. Posiblemente por algún error metodológico que afectó principalmente a la parte aérea (Figura 2.3.5) ya que no tuvo el mismo comportamiento que los restantes pH de esa misma fuente. Plantas cultivadas con la fuente  $NH_4^+$  pueden experimentar una alta relación R/T como fue detectado por Chen *et al.* (2013) en cultivares de arroz e Imsande (1986) en soja. El girasol es otra de las especies que tiene un crecimiento radical inicial rápido y vigoroso en comparación a maíz y soja, ampliamente estudiados en la región pampeana (Andrade y Sadras 2002). Las raíces de girasol alcanzan los 50 cm de profundidad en el estado de dos hojas (Andrade y Sadras 2002). Por su parte, el algodón al ser originario de regiones áridas y semiáridas, prioriza el crecimiento radical por sobre el aéreo en las primeras etapas (hasta inicio de floración a los 60 DDS), a partir del cual cambian los destinos y pasan a priorizar los frutos (Brouder y Cassman 1990). Las dos especies evaluadas al parecer tendrían la capacidad de crecer y priorizar la parte subterránea en los estados iniciales, característica importante para explorar un mayor volumen de suelo y de adquisición de nutrientes y agua.



La fuente de N modificó dramáticamente la morfología radical de girasol. Las plantas alimentadas con  $\text{NH}_4^+$  tuvieron una morfología más favorable para la absorción de nutrientes (raíces más finas, mayor longitud específica y área específica radical) que la fuente  $\text{NO}_3^-$ . Thomson *et al.* (1993) en plantas de poroto observaron similares resultados (mayor longitud radical) con la fuente  $\text{NH}_4^+$  que con  $\text{NO}_3^-$ . Bloom *et al.* (2003) en plantas de tomate con esta fuente observaron longitud de raíces mayores que con  $\text{NO}_3^-$ , atribuyendo principalmente al equilibrio funcional en la relación tallo-raíz y el balance entre  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{NO}_3^-$  en el suelo. Schortemeyer *et al.* (1993) en plantas de maíz tratadas con  $\text{NH}_4^+$  experimentaron cambios en la morfología radical, debido a que las raíces serían un destino de los carbohidratos y de ciertos tipos de hormonas. Hartung *et al.* (2002) reportaron que las células radicales mantienen una alta concentración de ABA en situaciones de estrés, siendo ésta una de las hormonas que promueven el crecimiento radical sobre el aéreo. Fernandez *et al.* (2009) detectaron diferencias en longitud radicular ante situaciones deficitarias de P. En girasol, tal vez sea una característica morfológica importante en situaciones de adaptación a la oferta de N. Por el contrario, con la fuente  $\text{NO}_3^-$  el girasol resultó menos eficiente en relación a las otras dos fuentes, mientras que la fuente  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  tuvo un comportamiento intermedio para la morfología radical.

La concentración de N en plantas de girasol tuvo una tendencia contrastante al pH alcalino (7,5): un efecto negativo para la fuente  $\text{NO}_3^-$  y positivo (i.e. incremento) para la fuente  $\text{NH}_4^+$ . Una respuesta puede deberse a que algunas especies tienen la capacidad de incrementar la absorción de  $\text{NH}_4^+$  con incrementos del pH, ya que son de menor toxicidad a este medio. Caso contrario sucede con la fuente  $\text{NO}_3^-$  en los cuales disminuye la absorción a los pH alcalinos y aumenta a los pH ácidos. Esto mismo fue detectado por Schortemeyer *et al.* (1993) en plantas de maíz.

Los primeros estudios citaban a la fuente de N como responsable del flujo de  $\text{H}^+$  a nivel rizósfera (Raven y Smith 1976; Marchner 1995; Britto y Kronzucker 2005). Son pocos los antecedentes que vinculan al pH del medio como responsables del flujo de  $\text{H}^+$  al medio (Hawkins *et al.* 2008; Hawkins y Robbins 2010). En la presente tesis, se observó que el pH del medio resultó ser más importante que la fuente de N en el flujo de  $\text{H}^+$ . En el caso de algodón y girasol no se encontró literatura del efecto del pH y la fuente de N sobre el flujo de  $\text{H}^+$  en las membranas plasmáticas, por lo que estos resultados son un aporte relevante al conocimiento científico. Los experimentos de esta tesis mostraron que las raíces de girasol y algodón cultivados en un medio ácido (4,5) producen un flujo negativo de  $\text{H}^+$  (ingreso a la célula) y por consiguiente una alcalinización a la rizósfera, independientemente de la fuente de N suministrada. Esto se debió a que la concentración de  $\text{H}^+$  en el medio externo (pH 4,5), de mayor concentración que el interno (citósol=7,3), generó un gradiente de concentración ( $[\text{H}^+]_{\text{out}} > [\text{H}^+]_{\text{int}}$ ) y el ingreso forzado de  $\text{H}^+$  a la célula radical. Esto mismo fue observado por Hawkins y Robbins (2010) en soja. Schubert *et al.* (1990) observaron que *Vicia faba* en suelo ácido presentaba una inhibición en la liberación de  $\text{H}^+$ .

Las plantas que fueron suministradas con la fuente  $\text{NH}_4^+$  tendrían que haber liberado  $\text{H}^+$  y acidificar el medio como consecuencia del equilibrio químico homeostático celular, como fue citado por numerosos autores. Sin embargo eso no ocurrió. Se deduce que la planta absorbería  $\text{NH}_4^+$ , pero parte es devuelto al medio externo evitando la fitotoxicidad (Britto *et al.* 2001; Ludewig *et al.* 2002). Este flujo salida del  $\text{NH}_4^+$  involucra un gasto de energía como cito Britto *et al.* (2001). En esta tesis el pH ácido afectó tanto la vía de crecimiento (evitando la toxicidad) y el funcionamiento o alteración de las membranas plasmática. Las fuentes  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NH}_4\text{NO}_3$

a pH ácidos también alcalinizaron el medio. Las plantas que crecieron con  $\text{NO}_3^-$  estarían en equilibrio homeostático con las células radicales (Haynes 1990), y favorecidas aún más por el medio ácido.

Cuando el pH del medio tratado fue 6,0 y 7,5 se restableció la liberación de  $\text{H}^+$  al medio, y fue independientemente de la fuente de N. No se determinó el flujo de N a través de las membranas, pero en el caso de girasol y la fuente  $\text{NH}_4^+$  posiblemente hubo una menor salida de este compuesto al medio externo, por su mayor concentración de N en tejidos para el pH más elevado del experimento.

En girasol a los pH 6,0 y 7,5 las tres fuentes de N experimentaron una acidificación, en algodón no sucedió lo mismo. El girasol fue citado como una especie de fuerte acidificación en relación a otras especies (Römhed *et al.* 1984; Faggioli 2008). Algodón experimentó una acidificación solo al pH 6,0 con las fuentes  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ .

## 2.5 CONCLUSIONES

La acumulación de biomasa en las especies de algodón y girasol dependió principalmente de la forma de N suministrada. Las formas que derivaron en mayor crecimiento fueron  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  y  $\text{NO}_3^-$ , mientras la de menor, fue  $\text{NH}_4^+$ . La biomasa radical en plantas de girasol tratadas con la fuente  $\text{NH}_4^+$  se redujo proporcionalmente más que la de algodón en relación a  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , sin embargo presentó una morfología radical más favorable que las restantes fuentes de N, lo que se traduciría en una mayor eficiencia en costos energéticos.

El pH del medio no afectó el crecimiento, tampoco se verificó interacción entre los factores fuente de N y pH del medio sobre el crecimiento de las plantas de girasol y algodón. El pH del medio afectó el flujo de  $\text{H}^+$  para las dos especies. Aquellos medios con pH ácidos presentaron una alcalinización rizosférica, por el contrario medios de pH 6,0 y 7,5 acidificaron la rizósfera. Este flujo de  $\text{H}^+$  fue independiente de las fuentes de N aplicadas.

## **CAPITULO 3:**

### **ACIDIFICACIÓN RIZOSFÉRICA EN SOJA: ROL DE LA NUTRICIÓN NITROGENADA Y EL pH DEL MEDIO.**

### 3.1 INTRODUCCIÓN

Las leguminosas tienen la capacidad de formar asociaciones con bacterias fijadoras de N atmosférico ( $N_2$ ), lo cual contribuye a disminuir la extracción de este nutriente del suelo (ej. Gioda y Baigorri 1997). Eso no implica que este cultivo tenga balance positivo de N. Salvagiotti *et al.* (2008) destacaron que el balance del N en el suelo es levemente negativa a neutral para cultivos de soja cuando se incluye a la fijación biológica.

Las bacterias fijadoras de N aportan entre un 30 al 70% del N total requerido por la soja (Salvagiotti *et al.* 2008, 2009). Esta proporción cae drásticamente en situaciones de alto nivel de N en el suelo, se aplican fertilizantes nitrogenados, existe déficit de agua, pH ácidos, bajas concentraciones de oxígeno (compactación), incompatibilidad entre cepa y cultivo o cuando la población del inoculo es baja, entre otros (Parker y Harris, 1977; Purcell y King 1996). Por su parte Alcana *et al.* (2012) observaron que ante situaciones deficitarias de P la menor acumulación de biomasa en plantas de poroto, con un reducido número de nódulos totales por planta y peso individual del nódulo. Salvagiotti *et al.* (2009) en una amplia revisión bibliográfica sobre fertilización en soja, observaron que el porcentaje de aporte a través de la fijación biológica de N disminuye con incrementos del N del suelo (suelo + fertilizante). Gioda y Baigorri (1997) observaron que existe una relación inversa entre la tasa de fijación de N atmosférico y el N del suelo. Salvagiotti *et al.* (2008) en sus compilaciones con ensayos de fertilización en soja observaron que la aplicación de N no provoca incrementos en el rendimiento final, resultando en prácticas económicamente infructuosas. Sin embargo, en un número relativamente menor de esos ensayos, la fertilización ofreció respuesta positivas, quizás porque se desarrollaron en ambientes de alta producción, donde la oferta de N desde la fijación, no cubría los requerimientos nutricionales del cultivo (Salvagiotti *et al.* 2009).

Gulden y Vessey (1998) observaron que plantas de soja inoculadas y no fertilizadas (cultivadas en macetas) presentaron la menor acumulación de biomasa total que aquellas plantas crecidas con el inóculo y fertilizada con N-  $NH_4^+$  a concentraciones de 0,1; 1,0 y 2,0 mM. Estos autores destacaron que los tratamientos combinados, N (dosis intermedia) e inóculo, presentaron un efecto estimulativo de la biomasa. Por el contrario los tratamientos con dosis alta de N y solo los abastecidos por la cepa bacteriana, el crecimiento fue reducido. Similarmente, en plantas de poroto, Gylan'ko *et al.* (2009) observaron que las altas dosis de N mineral afectaban la adhesión de bacterias en las raíces al incidir en la síntesis y exudación de flavonoides e isoflavonoides.

La forma predominante del N en el suelo también afectaba a la nodulación, incidiendo en la exudación de compuestos fenólicos liberados por las raíces (Gulden y Vessey 1998). Estos actuarían como quimio-atractores o repeliendo a las bacterias (Gylan'ko *et al.* 2009). También la distribución de los nódulos en las raíces es afectada por las formas de N en el suelos, como fue detectada por Bollman y Vessey (2006) en plantas de poroto. Ellos observaron que la fuente  $NO_3^-$  provoca una mayor inhibición que la fuente  $NH_4^+$ , implicando que existen diferentes mecanismos de inhibición según la fuente del medio (Fei y Vessey 2004; Gylan'ko *et al.* 2009). Otros nutrientes como el P podrían actuar en la iniciación, crecimiento y funcionamiento de los nódulos (Israel y Jackson 1982). Faggioli (2008) ante condiciones limitantes de P observó un aumento del número de nódulos por raíz en detrimento del peso individual del nódulo (mg) y el peso total de nódulos por planta. Unas de las formas indirectas para detectar el efecto inhibitorio de los nódulos es mediante la “nodulación específica” indicando la cantidad

de nódulos que puede sostener o abastecer un g de raíz a lo largo de un periodo de tiempo (Gulden y Vessey 1997, 1998; Bollman y Vessey 2006).

Como se mencionó en capítulos anteriores, la mayoría de las especies cultivadas alcanzan las máximas tasas de crecimiento y rendimiento cuando son suministradas con las formas  $\text{NO}_3^-$  o  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . Por el contrario, las plantas con  $\text{NH}_4^+$  tienden a presentar menores tasas de crecimiento. El caso de soja no es tan lineal. Por ejemplo, Imsande (1986), trabajando con plantas de soja de 27 días y sin inocular, no encontró diferencias entre las fuentes  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NH}_4^+$ . En soja inoculada, el proceso es distinto ya que altas concentraciones de N inciden directamente en los procesos de fijación de N atmosférico (Bollman y Vessey 2006; Salvagiotti *et al.* 2009). Es así que (Imsande 1998) reportó que plantas de soja sin inocular pero fertilizadas con N- $\text{NO}_3^-$ , presentaban un crecimiento menor en relación a las que recibían el tratamiento combinado, inóculo mas N a bajas concentraciones. Ralston y Imsande (1983) encontraron que las concentraciones iguales o superiores a 2 mmolar de  $\text{NO}_3^-$  ( $124 \text{ mg NO}_3^- \text{ l}^{-1}$ ) restringían el desarrollo de los nódulos en soja.

Cuando interviene el pH del medio en forma conjunta con el N, el abanico de respuestas es aún más complejo, ya que la nodulación y la tasa de crecimiento puede ser afectada por ambos factores. Tolley-Henry y Raper (1986) observaron que plantas de soja exhibían el menor crecimiento asociado con ambientes ácidos y fuentes amoniacales ( $\text{NH}_4^+$ ). El efecto combinado que ejerce el medio de crecimiento sobre las plantas, (pH x N), podrían alterar la acumulación de biomasa y hasta detectarse efectos distintos sobre los diferentes órganos de la planta. Vessey (1990) evaluó el efecto combinado del pH del medio (4,5; 5,0; 5,5; 6,0 y 6,5) y formas de N ( $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NH}_4^+$ ); no encontraron diferencias significativas para biomasa total y N total en los tratamientos evaluados, excepto para la combinación  $\text{NH}_4^+$  y pH 4,5 registrando los menores valores.

A nivel radical el efecto de las fuentes de N también altera el pH rizosférico interfiriendo en la absorción de algunos nutrientes. Riley y Barber (1971) observaron que las raíces de soja inoculadas producían una mayor acidificación rizosférica cuando fueron crecidas con la fuente  $\text{NH}_4^+$  que aquellas que lo hacían con  $\text{NO}_3^-$ , aumentando la solubilidad del P y resultando en una mayor absorción y acumulación de ese nutriente en sus tejidos.

El pH del medio afecta la solubilidad de nutrientes como el P,  $\text{Fe}^{++}$ ,  $\text{Mn}^{++}$ , y Zn. (Marchner 1995). Youssef y Chino (1989) observaron en cebada y soja que la liberación de  $\text{H}^+$  u  $\text{OH}^-$  al medio era dependiente del pH, pero independiente de la fuente de N. Sas *et al.* (2002) en sus experiencias con lupino cultivado sobre distintas formas de N y pH neutro (5,6), detectaron una elevada extrusión de  $\text{H}^+$  con la fuente  $\text{NH}_4^+$ , la cual disminuía para las formas  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  y  $\text{N}_2$ . Por el contrario, las plantas cultivadas con  $\text{NO}_3^-$  alcalinizaban el medio. Hawkins y Robbins (2010) observaron que plantas de soja crecidas con  $\text{NH}_4^+$  y ambientes ácidos alcalinizaban el medio, diferente a lo experimentado por especies de coníferas habitués de estos ambientes. Estos autores destacaron que la soja no era capaz de incrementar la actividad (funcionalidad) o la concentración (por unidad de M.P) de las proteínas ATP-asa situadas en las MP, mientras las coníferas si lo hacían. En el capítulo 2 de la presente tesis se observó que el flujo de  $\text{H}^+$  al medio, en plantas de algodón y girasol, fue afectado por el pH del medio, independientemente de la forma de N suministradas a las plantas. Este flujo de  $\text{H}^+$ , estaría vinculado al funcionamiento de las ATPasas en las MP, considerado uno de principales promotores en la toma de nutrientes. Tang (2001) trabajando con dos genotipos de poroto observó una relación positiva entre excedentes de cationes absorbidos y la tasa de liberación de  $\text{H}^+$  al medio. Alkama *et al.* (2012) encontraron que

algunas líneas de poroto presentaban una relación positiva entre la liberación de  $H^+$  y la permeabilidad del oxígeno en el nódulo. Ellos vincularon este efecto a la fijación de N.

La literatura indica que no abundan los antecedentes en soja sobre el efecto de la interacción del pH del medio y las formas de N sobre la acidificación rizosférica. En el caso de las leguminosas, esta situación es compleja, ya que además de las formas de N del suelo se suma el N proveniente de la fijación simbiótica.

### 3.1.1 Objetivos e Hipótesis

El objetivo de este capítulo fue evaluar el efecto combinado del pH del medio y las fuentes de N (incluyendo la fijación simbiótica) sobre los parámetros de crecimiento, morfología radical, acumulación de N y la liberación de  $H^+$  en la rizósfera de plantas de soja. Las hipótesis a probar son las siguientes:

1. Existe interacción significativa entre las fuentes de N y pH para la acumulación de biomasa total, morfología radical y contenido de N.
2. No existe interacción significativa entre los factores principales fuente de N y pH del medio sobre la liberación de  $H^+$  en la rizósfera de las plantas de soja.

## 3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

### Experimento I y II

#### 3.2.1 Condiciones experimentales:

Se realizaron dos ensayos, denominados experimentos I y II. Estos diferían en días de duración y fuente de N, manteniéndose los mismos pH en los dos experimentos. Tuvieron lugar en el invernáculo de la Facultad de Agronomía de la UBA y las determinaciones fueron realizadas en la Cátedra de Fertilidad y Fertilizantes de dicha Facultad. El invernáculo contó con lámparas halógenas y un sistema de calefacción y refrigeración automático. Se proveyó de un fotoperíodo de 14 hs de luz y 10 hs de oscuridad, y temperaturas entre 20-38 °C. La variedad utilizada fue Nidera NA 5509 de grupo de madurez 5 medio, y hábito de crecimiento indeterminado, buen comportamiento a diferentes ambientes y un largo de ciclo de 151 días.

El sustrato donde crecieron las plantas fueron soluciones hidropónicas. Se utilizaron las mismas bateas que en el capítulo 2 tanto en el pretratamiento (25 l) y en los tratamientos (12 l). Las soluciones base surgieron de Faggioli (2008), y se formularon de modo de alcanzar un crecimiento sin restricción de nutrientes para la planta. Cada batea fue aireada mediante una bomba tipo acuario. El agua utilizada para las soluciones fue desmineralizada y obtenida de un equipo de filtración de agua Deionex modelo MC-160.

*Germinación:* Se procedió según la misma metodología empleada en el Capítulo 2. La duración de la etapa fue de 7 días.

*Pretratamiento:* Luego de la etapa de germinación, las plántulas fueron seleccionadas por similar estado de crecimiento y llevadas al pretratamiento. La duración del pretratamiento fue de 10 días. La distribución de las plantas en las planchas de tergopol fue igual a lo descrito en el Capítulo 2 (Figura 2.2.1). El Experimento I contó con dos soluciones en el pretratamiento ( $NH_4NO_3$  e inóculo), mientras en el experimento II se usaron tres soluciones diferentes ( $NH_4NO_3$ , inóculo y la combinación entre ambas fuentes) (Tabla 3.2.1).

La inoculación con la bacteria fue realizada al inicio de esta etapa con *Bradyrhizobium japonicum* a una concentración de  $10^5$  bacteria  $ml^{-1}$ . Para esta etapa el

experimento “I” tuvo una solución hidropónica denominada inóculo (sin N inorgánico en la solución) la cual consistió simplemente en inocular la semilla de soja. Mientras que el experimento “II” contó con dos soluciones de inoculación, y uno de ellos recibió el suministro N inorgánico a una baja concentración (Tabla 3.2.1). La composición de las soluciones nutritivas de los experimentos I y II es presentada en la tabla 3.2.1. El pH de la solución fue mantenido en un rango de 5,9 y 6,1 con el agregado de álcali (KOH) o ácido clorhídrico (HCl) y una frecuencia de medición diaria, tanto en el experimento I y II. El cambio de solución se hizo a los 6 días para evitar el agotamiento de la solución nutritiva o la distorsión de la solución por los compuestos exudados.

Tabla 3.2.1. Composición nutritivas de las soluciones empleadas en el pretatamiento y tratamiento de los experimentos I y II.

Etapas	Experimento I – (mmol l <sup>-1</sup> )				Experimento II (mmol l <sup>-1</sup> )		
	PT - T	T	T	PT - T	PT - T	PT - T	PT - T
Fuentes de N	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Inóculo	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> + Inóculo	Inóculo
KNO <sub>3</sub>		2,5					
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>		1,5					
SO <sub>4</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>			2,75				
Ca CL <sub>2</sub>	1,5	1,5	2,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Mg SO <sub>4</sub>	0,5	1,0	1,0	0,5	0,5	0,5	0,5
K CL			2,5				
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,5	1,0		1,0	1,5	1,5	1,5
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	2,75				2,75	0,125	
Mg CL <sub>2</sub>	0,025			0,025	0,025	0,025	0,025

(PT) Pretratamiento , (T) Tratamiento

*Tratamientos:*

En esta etapa las plantas fueron llevadas a bateas de 12 litros de capacidad. Las bateas presentaban tapas de plástico con 2 perforaciones donde fueron alojadas las plantas. Ellas eran sostenidas por un listón de guata en la base del tallo cómo fue descrito en el capítulo 2. Las plantas provenientes del pretratamiento fueron seleccionadas por similar estado de crecimiento y dispuestas en los tratamientos. En el experimento I las plantas que provenían del pretratamiento, solución de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , pasaban a formar parte de tres soluciones de diferentes fuentes de N inorgánico (Tabla 3.2.2). Las que provenían del inóculo continuaban en esta misma solución (Tabla 3.2.2); luego estas 4 diferentes soluciones nombradas por sus fuentes de N fueron llevadas a los tres pH establecidos.

En el experimento II tanto el pretratamiento como el tratamiento tenían las mismas fuentes de N (Tabla 3.2.2). En esta etapa cada fuente de N era llevada a los tres pH de 4,5-6,0-7,5.

Tabla 3.2.2 Etapas, duración en días, solución del medio, pH de crecimiento para los experimentos I y II en soja.

	Etapas	Germinación	Pretratamiento	Tratamiento
Experimento I	Duración en días	0-7[7]	7-17[10]	17-33[17]
	Solución del medio	Agua	1- $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 2-Inóculo	1- $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 2- $\text{NO}_3^-$ 3- $\text{NH}_4^+$ 4-Inóculo
	pH del medio de crecimiento	5,8	6,0	4,5 6,0 7,5
Experimento II	Duración en días	0-7[7]	7-17[10]	17-41[24]
	Solución del medio	Agua	1- $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 2-Inoculo +N <sub>inórg.</sub> 3-Inóculo	1- $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 2-Inoculo +N <sub>inórg.</sub> 3-Inóculo
	pH del mediod e crecimiento	5,8	6,0	4,5 6,0 7,5

[ ] duración en días de las etapas de crecimiento.



Las soluciones con las fuentes de N inorgánico contaron con una concentración de 5,5 mM para este nutriente (Tabla 3.2.2) tanto en el experimento I y II. Mientras en el experimento II solo cuando fue combinada con el N inorgánico más el inóculo la concentración de N fue de 0,125 mM (Tabla 3.2.2). En cuanto a los micronutrientes se utilizó la misma que en el pretratamiento. La duración de la etapa de tratamiento fue de 16 días en el experimento I, mientras en el experimento II de 24 días. La duración en días totales de los experimento I y II fueron de 33 y 41 días respectivamente.

### 3.2.2 Determinaciones:

*Mediciones de pH:* Se utilizó un pHmetro marca Orion 410 tanto en las mediciones de las bateas de 25 y 12 litros como para las mediciones de liberación de  $H^+$  en los tubos de ensayos. Los pH fueron mantenidos en los niveles de cada tratamiento mediante el agregado de hidróxido de sodio (0,5 y 4 M) o ácido sulfúrico (0,1 y 0,5 M).

*Liberación de  $H^+$ :* Se procedió de forma similar al capítulo 2, empleándose los mismos recipientes y tubos de ensayo. El experimento I la tasa de liberación de  $H^+$  consistió de mediciones en tres tubos de ensayo o submuestras por planta y la solución empleada fue agua destilada a los pH de tratamientos. El experimento II contó con cuatro tubos de ensayo por planta de muestreo. En dos de los tubos se empleó agua destilada a los pH de tratamiento, mientras en los otros dos tubos contenían a la solución del tratamiento de la cual provenían.

*Cosecha de plantas y medición de biomasa seca:* En el experimento I se hicieron en tres momentos distintos durante el crecimiento de las plantas. La 1<sup>ra</sup> al comienzo del tratamiento (16 DDS). Las siguientes cosechas fueron a los 12 días (28 DDS) y 17 días (33 DDS) de tratamiento. Con estas mediciones se determinó la tasa de crecimiento de la planta (TCP). En Experimento II, la cosecha se hizo a los 24 días de tratamiento (o 41 DDS)

Las plantas cosechadas fueron separadas en hoja, tallo y raíz y secadas durante 3 días a 70°C, excepto la raíz. Esta última era congelada para una posterior medición de morfología radical y luego recién se procedió al secado en estufa. Se determinó biomasa seca total, aérea y radical. También se determinó la concentración de N en planta y N total, utilizando Kjeldhal modificado. Se determinó el área radical total (ART) área específica radical (AER), longitud radical total (LRT) longitud específica radical (LER) y diámetro radical promedio empleándose el programa Winrhizo versión 2008.

A los 41 DDS en el experimento II se determinó el contenido de N total a través de las distintas fuentes de N, ya sea el proveniente de semilla, de nódulos y el N mineral de la solución.

En los dos tratamientos que contenían a las cepas con las bacterias fijadoras de N, denominadas “inóculo” y “N + inóculo” se determinó el número y peso de nódulos por planta a los días 26, 33 y 41 (DDS). Con estos se obtuvo: número de nódulos por planta, peso total de nódulos por planta, nodulación específica (número y peso de nódulos por g de raíz), peso promedio de nódulo. Estas variables fueron relacionadas con la biomasa radical y la concentración de N.

### 3.2.3 Análisis estadístico

El diseño estadístico empleado fue un factorial en bloques al azar con dos factores principales (pH y fuente de N). Los experimentos I y II contaron con tres niveles para el factor pH (4,5; 6,0; 7,5). Los niveles de N fueron diferentes en los dos experimentos, cuatro niveles de N para el Experimento I y tres niveles de N para el Experimento II (Tabla 3.2.2). Se hicieron cuatro repeticiones para cada tratamiento. Se

utilizó ANOVA y Test de Tuckey ( $p < 0,05$ ). El programa utilizado fue Infostat/Profesional versión 1.1. Para la medición de liberación de  $H^+$  se procedió a transformar los datos originales a la variable rangos para conseguir homogenizar la varianza. En los tratamientos con los pH 6,0 y 7,5 para la variable liberación de  $H^+$  se utilizó el test de “t” para determinar si los valores se diferenciaron de cero.

### 3. 3. RESULTADOS:

#### Experimento I

##### 3.3.1 Parámetros de crecimiento

La biomasa total, biomasa aérea, biomasa radical y la relación raíz-tallo fueron afectadas por el pH, la fuente de N y la interacción entre ambos factores (Tabla 3.3.1; Figura 3.3.1). Las plantas con mayor biomasa total fueron para los tratamientos con  $NH_4NO_3$  y  $NO_3^-$ . Las plantas inoculadas fueron las de menor crecimiento en biomasa total, aérea y radical. Las plantas tratadas con  $NH_4^+$  presentaron una reducción significativa de la biomasa total y aérea cuando el medio fue ácido en relación al pH más alto. La biomasa aérea con la fuente  $NH_4NO_3$  experimentó una reducción significativa al pH ácido, sin embargo esta reducción no fue significativa para la biomasa radical, traduciéndose en una alta relación raíz-tallo (Figura 3.3.1), diferenciándose del resto de los tratamientos.

Tabla 3.3.1 Resultados de Anova y valores de “p” para los parámetros de crecimiento a los 33 DDS en plantas de soja, Experimento I

	Biomasa	Biomasa	Biomasa	Relación
	total	aérea	radical	R-T
Fuente (N)	0,0001**	0,0001 **	0,0001 **	0,0049 **
pH	0,0009 **	0,0005 **	0,7258	0,0196 *
N x pH	0,0373 *	0,0423 *	0,0270 *	0,0330 *

Niveles de significancia:  $p < 0,05$  (\*);  $p < 0,01$  (\*\*);  $p > 0,05$  (ns)

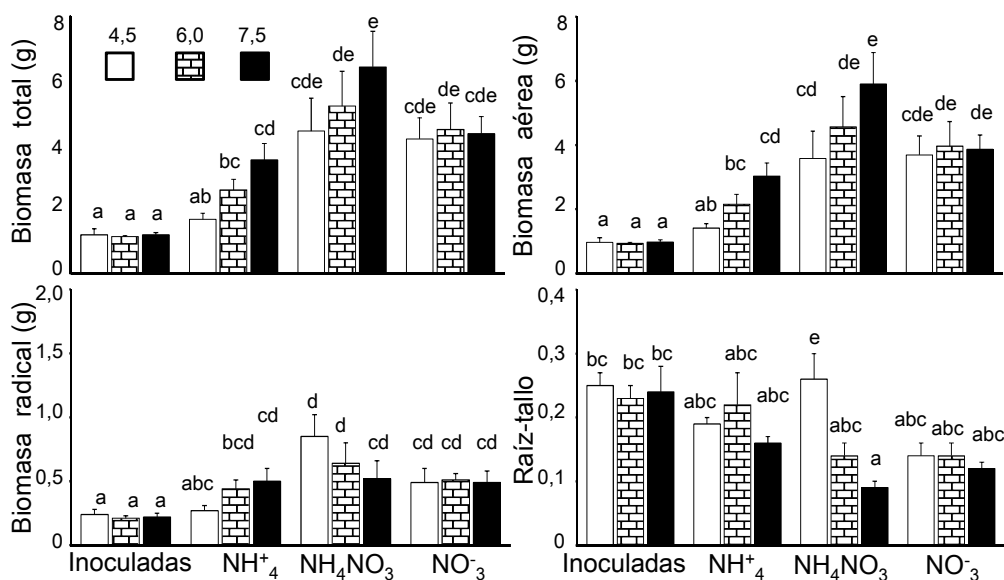


Figura 3.3.1. Efecto de Fuentes de N y pH para biomasa total, aérea, radical y relación raíz-tallo para Soja, Experimento I, a los 33 DDS. Las barras indican el error estándar. Letras similares no presentan diferencias entre tratamientos al nivel 0,05 y  $a < b < c$ .

La tasa de crecimiento de las plantas (TCP) presentó interacción entre momento (DDS) y fuente de N, además de presentar diferencia significativa para las variables: pH, fuentes de N y momento o días (Tabla 2 Anexo y Figura 3.3.2). La figura 3.3.2 muestra la TCP para las distintas fuentes de N, tomando como promedio los tres pH. Las plantas inoculadas a los 22 y 28 días produjeron la menor TCP diferenciándose del resto de los tratamientos. A los 33 días la TCP para los tratamientos NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> y NO<sub>3</sub><sup>-</sup> presentaron valores más elevados, diferenciándose significativamente de las plantas con NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e inoculadas.

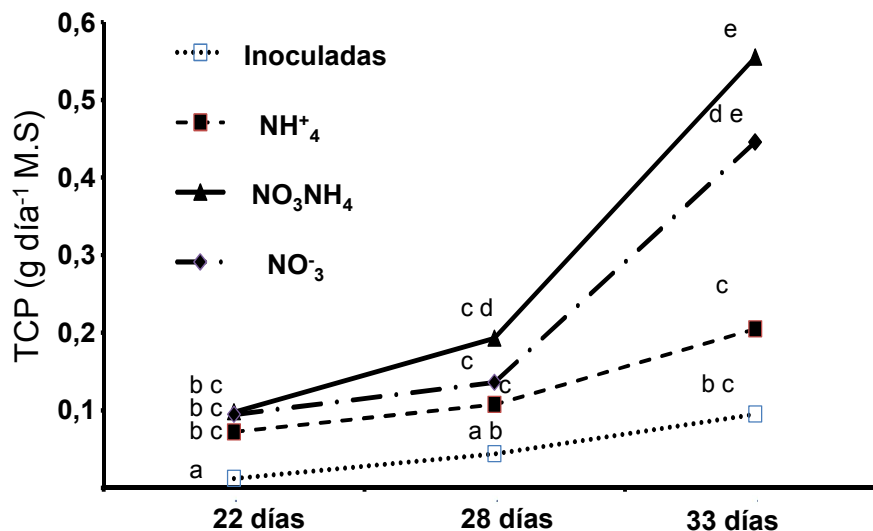


Figura 3.3.2. Experimento I, evolución de la tasa de crecimiento de las plantas (TCP), expresado en g por día, para sucesivas cosechas 22, 28 y 33 DDS en plantas de soja. Se indica a las fuentes de N (Inoculadas,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) como promedio de los tres pH. Letras similares no presentan diferencias entre tratamientos al nivel 0,05 y  $a < b < c$ .

### 3.3.2 Morfología radical

La morfología de las raíces fue significativamente afectada por la fuente de N. En cambio, no se observaron efectos significativos del pH ni de la interacción entre ambos factores (Tabla 3.3.2). Las plantas cultivadas con  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  tuvieron raíces más largas, más finas y de mayor superficie que las crecidas con  $\text{NH}_4^+$  e inoculadas (Figura 3.3.3).

Tabla 3.3.2 Anova y valores de “*p*” para variables morfológicas de raíz en plantas de soja, de 33 DDS. Experimento I. LRT: longitud radical total; LER: longitud específica radical; ART: área radical total; AER: área específica total y diámetro promedio radical.

		Parámetros radicales				
		LRT	LER	ART	AER	Diámetro
Fuente de N		0,0003**	0,0001 **	0,0008 **	0,0015 **	0,0004 **
pH		0,54	0,63	0,59	0,56	0,38
F x pH		0,26	0,089	0,32	0,10	0, 06
Fuentes de N	Inóculo	119,4 a	63,0 a	94,9 a	634,4 a	0,33 b
	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	193,0 a	65,7 a	180,1 a	640,2 a	0,34 b
	NO <sub>3</sub> NH <sub>4</sub>	635,9 b	116,6 b	540,8 b	981,6 ab	0,27 a
	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	719,5 b	180,8 c	566,9 b	1387,5 b	0,25 a

Test de Tuckey con un  $\alpha$  0,05 (\*\*<0,01 y \*<0,05).

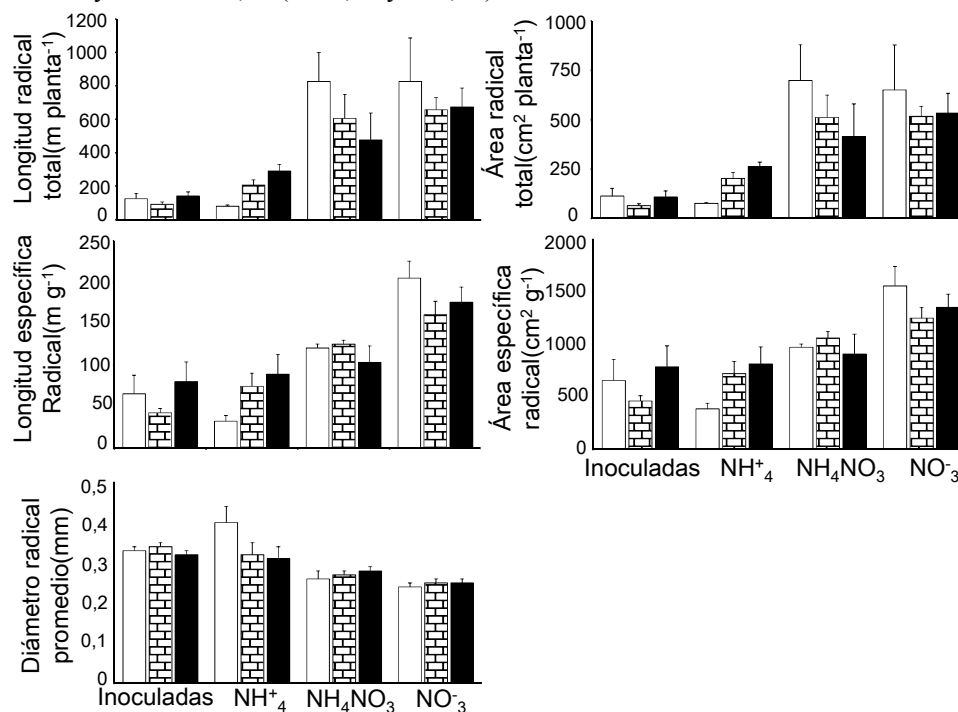


Figura 3.3.3. Efecto de Fuentes de N y pH para morfología radical: longitud radical específica (LER), área radical específica (AER), longitud total por planta (LRT), área total por planta (ART) y diámetro promedio de raíces en Soja, Experimento I; barras error estándar.

### 3.3.3 Liberación de H<sup>+</sup>:

A diferencia de lo hallado en los otros cultivos, en el caso de soja la liberación de H<sup>+</sup> fue afectada por la interacción entre los factores N x pH ( $p < 0,01$ ). Por un lado, la fuente NH<sub>4</sub><sup>+</sup> desencadenó una liberación de H<sup>+</sup> en todos los niveles de pH (Figura 3.3.4), mientras que las otras fuentes de N tendieron a elevar el pH rizosférico (liberación de OH<sup>-</sup> o toma de H<sup>+</sup>) a pH ácidos. A valores de pH 6,0 y 7,5 se produjo una acidificación rizosférica, independientemente de la fuente de N (Figura 3.3.4). Los medios con pH 6,0 y 7,5 las plantas crecidas con las 4 fuentes de N liberaron H<sup>+</sup> al medio ( $p < 0,01^{**}$ )

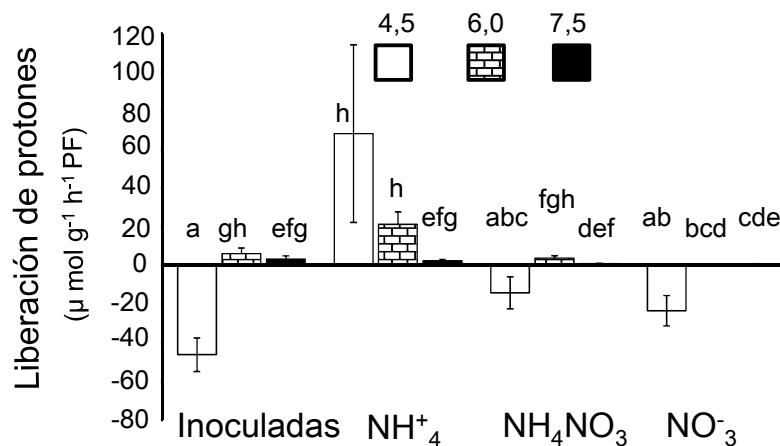


Figura 3.3.4. Efecto de las fuentes de N y los niveles de pH sobre la liberación de H<sup>+</sup> expresados en  $\mu \text{ mol g}^{-1} \text{ PF h}^{-1}$  para Soja, Experimento I, a los 33 DDS. Valores negativos (-) indican una alcalinización al medio rizosférico y positivos (+) una acidificación. Las barras indican el error estándar de las medias. Letras similares no difieren entre tratamiento para un  $p < 0,05$  y  $a < b < c$ .

## Experimento II

### 3.3.4 Parámetros de crecimiento:

Los resultados de este experimento difirieron del anterior ya que la biomasa total, biomasa aérea, biomasa radical y la relación raíz-tallo presentaron diferencias significativas solo debido a la fuente de N y no hubo efecto del pH ni de la interacción entre ambos factores. Las plantas con la fuente  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  produjeron la mayor biomasa total, aérea y subterránea que el tratamiento con N + inóculo; por el contrario las de menor producción en biomasa total y aérea se dio para aquellas plantas inoculadas solamente (Tabla 3.3.3 y Figura 3.3.5). La mayor relación raíz-tallo fue presentada por las plantas inoculadas en todos los rangos de pH, con cerca el 30% del total de la planta constituido por raíces, y la relación más baja fue para las plantas tratadas con  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ .

Tabla 3.3.3 ANOVA y valores de “p” para las variables de crecimiento, flujo de  $\text{H}^+$  y concentración de N y N total, en plantas de soja de 41 DDS. Las medias son indicadas cuando los factores principales den significancia ( $p < 0,05$ ) y no la interacciones. Experimento II.

	Factores principales		N x pH	Variable: Fuentes de N		
	Fuentes N	pH		Inoculadas	Inoculadas + N	$\text{NO}_3\text{NH}_4$
				g planta <sup>-1</sup>		
B. Total	0,0001**	0,0961	0,9892	1,69 a	2,97 b	8,63 c
B. Aérea	0,0001**	0,1097	0,9651	1,31 a	2,48 b	7,43 c
B. Radical	0,0001**	0,0846	0,3053	0,37 a	0,48 b	1,20 c
Relación R-T	0,0001**	0,2166	0,0879	0,29 c	0,19 b	0,16 a
<b>Flujo de <math>\text{H}^+</math></b>						
Solución	0.0019**	0.0001**	0.0012**			
Agua	0.0134*	0.0001**	0.0001**			
<b>Concentración de N</b>						
				mg g <sup>-1</sup>		
Concentración de N	0,0001**	0,1120	0,5807	10,8 a	16,3 b	31,3 c
<b>N total</b>						
				mg planta <sup>-1</sup>		
N total	0,0001**	0,0722	0,8267	18,3 a	48,3 b	270 c

Test de comparación de medias  $a < b < c$  y letras similares no presentan diferencias entre tratamientos al nivel de 0,05 usando el test de Tukey, \* y \*\* significancia al nivel 0,05 y 0,01 respectivamente, ns = no significancia al nivel 0,05

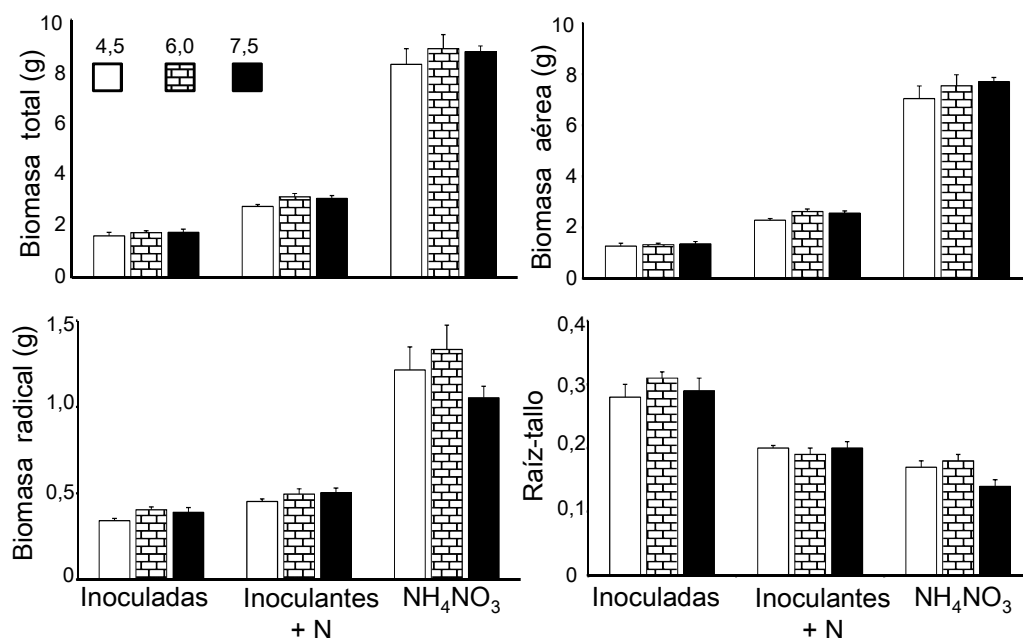


Figura 3.3.5. Experimento II, efecto de las fuentes de N y pH para biomasa total, biomasa aérea, biomasa radical y relación raíz-tallo a los 41 DDS en plantas de soja. Las barras indican el error estándar de los tratamientos.

### 3.3.5 Concentración de N en planta:

Tanto la concentración de N ( $\text{mg N g}^{-1}$  planta) como el N total ( $\text{mg de N planta}^{-1}$ ) presentaron diferencias debidas a la fuente de N (Tabla 3.3.3). Las plantas con la fuente de  $\text{NO}_3\text{NH}_4$  alcanzaron una concentración de N de  $31 \text{ mg g}^{-1}$  -3,1%- (Figura 3.3.6). Aquellas plantas tratadas con las fuentes N + inóculo e inoculadas produjeron solo el 50% y el 35% respectivamente de la concentración anterior.

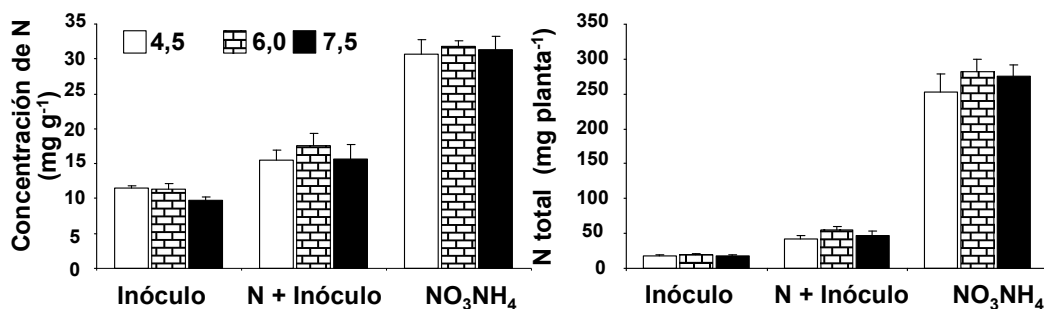


Figura 3.3.6. Concentración de N expresada en  $\text{mg g}^{-1}$  y contenido total de N expresados en  $\text{mg planta}^{-1}$  a los 41 DDS. Plantas de Soja, Experimento II. Las barras indican error estándar, con un alfa de 0,05.



El N total de las plantas siguió el mismo patrón que la biomasa total, con diferencias significativas a nivel fuente de N (Tabla 3.3.3). Las plantas que acumularon mayor N total fueron las tratadas con  $\text{NO}_3\text{NH}_4$  (270 mg N) diferenciándose estadísticamente de los tratamientos N + inóculo, que produjo el 18% y las inoculadas el 7% respecto a la primera fuente de N (Tabla 3.3.3; Figura 3.3.6).

### 3.3.6 Efectos de los factores N y pH sobre la nodulación

El peso de nódulos totales por planta aumentó a lo largo del tiempo y siempre hubo más nódulos cuando había N en el medio (Figura 3.3.7). El número de nódulos totales por planta, también fue mayor cuando hubo N + inóculo, pero existió un efecto significativo del pH, que se manifestó en la última medición: mientras que en los pH de 6,0 y 7,5 el número de nódulos se incrementó entre los 33 y 41 DDS, cuando se trató del pH 4,5 el número de nódulos se mantuvo en valores similares al de una semana antes de los 41 DDS (Tabla 3.3.4 y Figura 3.3.7)

Unas de las formas indirectas para determinar el efecto del N sobre la inhibición de la nodulación es mediante la “nodulación específica” que indica la cantidad de nódulos que puede sostener o abastecer un g de raíz a lo largo de un periodo de tiempo (Gulden y Vessey 1997, 1998; Bollman y Vessey 2006). La nodulación específica disminuyó en las sucesivas cosechas realizadas.

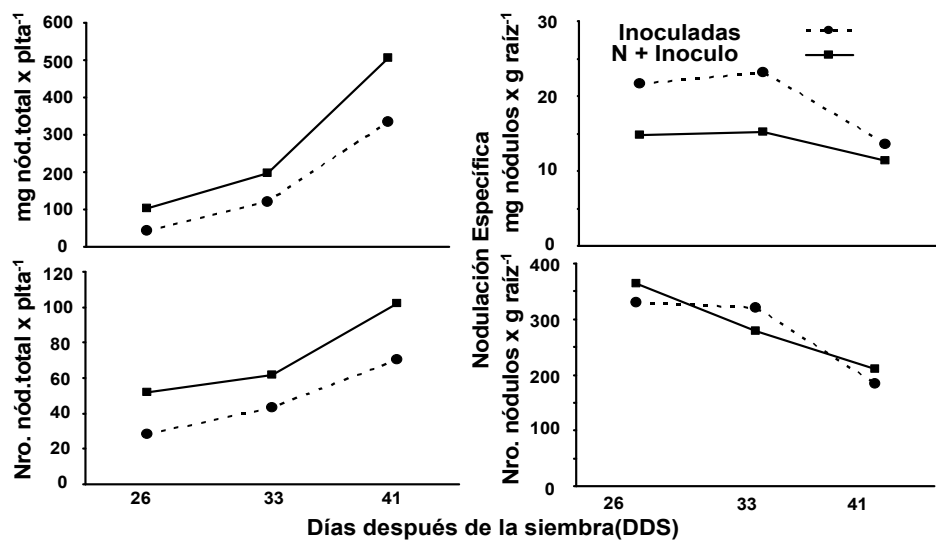


Figura 3.3.7. Experimento II. Panel derecha muestra la nodulación total en mg nódulos total planta<sup>-1</sup> y número de nódulos totales por planta<sup>-1</sup>, durante sucesivas cosechas a los días 26, 33 y 41 desde la siembra. El panel izquierdo muestra a la nodulación específica en mg de nódulos por g de raíz<sup>-1</sup> y número de nódulos por g raíz<sup>-1</sup> a los 26, 33 y 41 DDS.

El peso de nódulos por g de raíz fue alterada por los factores, pH, N y DDS (Tabla 3.3.4). Las plantas tratadas a pH 4,5 y 6,0 tuvieron un 25% menos del peso de los nódulos por g de raíz respecto de las plantas que se mantuvieron en el pH 7,5; mientras que las plantas con la fuente combinada “N + inóculo” tuvo una nodulación.

Tabla 3.3.4 Resultado del ANOVA y valores de “p” para: mg de nódulos por planta<sup>-1</sup>, número de nódulo por planta<sup>-1</sup> y nodulación específica (mg de nódulo por g de raíz y número de nódulo por g de raíz), en función del pH, fuente de N y DDS en plantas de soja de 41 DDS. Experimento II

						Nodulación específica		
		mg nódulo (PS) x planta <sup>-1</sup>	Nro. nódulo x planta <sup>-1</sup>			mg nódulo x g raíz <sup>-1</sup>	Nro. nódulo x g raíz <sup>-1</sup>	
pH	4,5					14,9 a		
	6,0					15,0 a		
	7,5					19,9 b		
Inóculo			47,2			19,4 b		
Fuente N	N + Inóculo		71,5			13,8 a		
		Inocu lo	N + Inocu lo					
			4,5	6,0	7,5			
DDS	26	41a	102ab	30,4 a	45,3a	43,2a	18,2b	346 b
	33	120b	179c	53,8 a	49,7a	54,7 a	19,2b	299 b
	41	334d	505e	61,1 a	97,2b	99,8 b	12,4 a	196 a
ANOVA								
Fuente		<0,01**		<0,01**		<0,01*	0,75	
pH		0,16		<0,01**		<0,05*	0,06	
DDS		<0,01**		<0,01**		<0,01*	<0,01*	
F x pH		0,46		0,61		0,58	0,58	
F x DDS		<0,01**		0,47		0,32	0,32	
pH x DDS		0,42		0,03*		0,32	0,32	
F x pH x DDS		0,90		0,66		0,16	0,16	

Medias de los tratamientos son indicados cuando den significativos ( $p < 0,05$ ) los factores principales y no para las interacciones, medias a>b>c.

del 29 % menos con respecto al tratamiento sólo inoculado. Al avanzar en el ciclo, la nodulación específica tendió a disminuir, ya que se obtuvo el menor valor a los 41 días con respecto a las mediciones anteriores (Tabla 3.3.4 y Figura 3.3.7). Debido a los efectos anteriormente descriptos de la fuente de N sobre la biomasa radical (Tabla 3.3.4), los resultados obtenidos en la nodulación específica combinaron los efectos ejercidos sobre el crecimiento de los nódulos y de las raíces. De hecho se encontró una

relación positiva y significativa entre peso promedio de los nódulos y la biomasa radical (Figura 3.3.8). A medida que avanzó el ciclo, se incrementó la biomasa radical y aumentó el peso promedio de los nódulos. El número de nódulos por g de raíz<sup>-1</sup> no fue afectado por la fuente de N ni por el pH, pero mostró una disminución conforme avanzó el ciclo la planta (Tabla 3.3.4); en consecuencia, se observó una relación negativa y significativa entre peso promedio de los nódulos y número de nódulos por g de raíz<sup>-1</sup> (Figura 3.3.8 ). Los mayores pesos promedio de nódulos fueron registrados a los 41 DDS en ambas fuentes de N, con valores entre 150 y 250 nódulos por g de raíz<sup>-1</sup>.

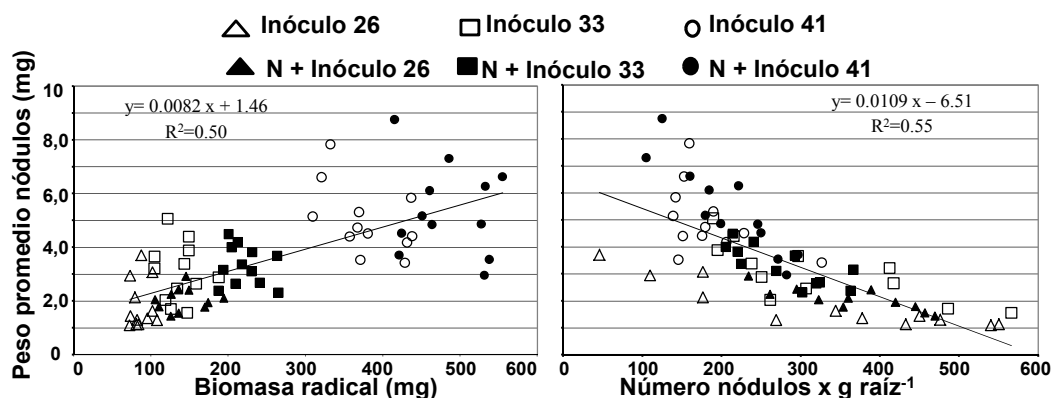


Figura 3.3.8. Peso promedio de nódulos en función de la biomasa radical y número de nódulos g de raíz<sup>-1</sup>, en cosechas a los 26, 33, 41 DDS, para los tratamientos Inóculo y N + Inóculo Soja, Experimento II.

### 3.3.7 Liberación de H<sup>+</sup>

La liberación de H<sup>+</sup> en la solución nutritiva presentó interacción entre los factores pH y fuentes de N (Tabla 3.3.2 y Figura 3.3.9). El medio de crecimiento con pH 4,5 las raíces produjeron una alcalinización en la solución, independiente de las fuentes de N (Figura 3.3.9). Cuando el medio estuvo a los pH 6,0 y 7,5 las raíces liberaron H<sup>+</sup> al medio (acidificación) y este fenómeno fue independiente de la fuente de N. Cuando se evaluó la liberación de H<sup>+</sup> en agua se observaron las mismas diferencias que en la solución anterior pero solo para los tratamientos con N + inóculo y NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (Figura 3.3.9).

Las raíces evaluadas en los medios con los pH 6,0 y 7,5 experimentaron una extrucción de H<sup>+</sup> al medio ( $p < 0,01^{**}$ ) diferente de cero, para las tres fuentes de N y las dos soluciones.

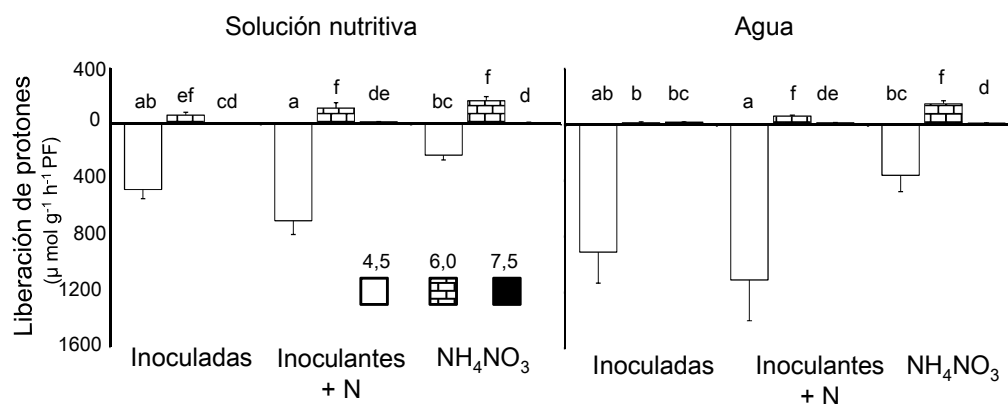


Figura 3.3.9. Liberación de  $H^+$  en la rizósfera de plantas de soja expresados en  $\mu\text{mol g}^{-1} \text{PF h}^{-1}$ , para los tratamientos: inoculado, N + inoculo y  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  en combinación con los pH 4,5 – 6,0- 7,5. Experimento II, a los 41 DDS. La figura izquierda, mediciones del flujo de  $H^+$  realizadas en soluciones nutritiva del tratamiento de origen y la figura derecha, realizada en soluciones con agua a los pH de tratamiento. Valores negativos (-) indica una alcalinización a la solución y valores positivos (+) una acidificación a la solución. Barras indican el error estándar para cada tratamiento y letras similares no difieren entre los tratamientos al nivel 0.05 y para medias  $a < b < c$ .

### 3.4. DISCUSIÓN

#### 3.4.1 Efecto de fuente de N sobre parámetros de crecimiento y absorción de N

Las plantas de soja presentaron respuestas a los parámetros de crecimiento en función de las formas de N suministradas y en línea con trabajos previos citados anteriormente. Las plantas que fueron cultivadas con  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  y  $\text{NO}_3^-$  promovieron las mayores tasas de crecimiento, no así la fuente con  $\text{NH}_4^+$  (interacción N x pH) cuando se combinó con el pH ácido. Esto mismo fue registrado por Vessey *et al.* (1990) en soja y Lang y Kaiser (1994) en cebada, quienes detectaron la menor viabilidad para la combinación de  $\text{NH}_4^+$  y pH ácidos. Este hecho se atribuyó a una limitación en la absorción de N, ya que esta combinación habría afectado el flujo normal de nutrientes. Se conocía bastante del efecto de la fuente  $\text{NH}_4^+$  sobre la mayoría de las plantas cultivadas, a través de síntomas por fitotoxicidad, fenómeno exacerbado en ambientes ácidos (Britto y Kronzucker 2002).

Las plantas cultivadas con  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  produjeron la mayor cantidad de raíces a pH ácidos, por el contrario la biomasa aérea resultó menor en relación a los pH superiores (6,0 y 7,5) similar a lo registrado en girasol (Figura 3.3.1). Esto se tradujo en una mayor relación raíz-tallo y por consiguiente mayor longitud y área total de raíces. No se encontraron bibliografía que pudiera aclarar este efecto. Posiblemente, este hecho podría asociarse a algún efecto hormonal favorecido por los pH ácidos para esta fuente como fue detectado por Brix *et al.* (2002) o simplemente el ambiente ácido que promueve el crecimiento como lo cito Bloom *et al.* (2003).

Las plantas tratadas con  $\text{NO}_3^-$  (Figura 3.3.4), fueron favorecidas por, altos valores tanto de longitud radical (LER) como por el área específica radical (AER) y con raíces más finas. Desde el punto de vista de las eficiencias, esto la convierte en una fuente eficiente en términos de costos energéticos, ya que con una menor inversión de recurso (carbono) explora un mayor volumen de suelo, favoreciendo la llegada de nutrientes, principalmente aquellos de poca movilidad como el P (Lambers *et al.* 2009; Fernandez 2011). Sin embargo es necesario más pruebas para confirmar este efecto.

Las plantas que fueron solamente inoculadas en el experimento I, acumularon menos biomasa total que aquellas nutridas con la fuente de N inorgánico. Este resultado estaría en línea con los trabajos de Gulden y Vessey (1998) y Bollman y Vessey (2006) quienes detectaron el menor crecimiento con plantas inoculadas solamente.

Los resultados obtenidos estarían asociados a que la fijación de N atmosférico no aporta todo el N necesario para el crecimiento de la planta sino parte de él, ya que la duración de los experimentos no fue lo suficientemente extensa para que la simbiosis pueda expresar su potencial (Zapata *et al.* 1987; Giorda y Baigorri 1997; Gulden y Vessey 1998; Salvagiotti *et al.* 2008). Para lograr dilucidar si el menor crecimiento se debió al estrés de N o a la duración del ensayo se planteó el experimento II de mayor duración (41 días) y un tratamiento adicional que combinó el aporte de N de la fijación (simbiosis) más el N-inorgánico a dosis bajas desde las etapas iniciales de crecimiento, simulando lo que sucede en los suelos. Los resultados del experimento II, mostraron que las plantas inoculadas, sin N inorgánico, tuvieron un comportamiento igual al anterior. Estas plantas acumularon en biomasa un 20% en relación a aquellas con  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , tal como se había verificado en el experimento I. El agregado de N a las plantas inoculadas aumentó el crecimiento con

respecto al inoculado, produjo un 35% de biomasa total con respecto a las plantas con  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . Esto concuerda con otros autores quienes registraron un aumento del crecimiento cuando fueron suministradas dosis bajas de  $\text{NH}_4^+$  en soja (Gulden y Vessey 1998; Bollman y Vessey 2006) y en poroto (Gulden y Vessey 1997). Posiblemente las dosis bajas de N inorgánico estimularían el crecimiento tanto radical como nodular (Gulden y Vessey 1997, 1998; Fei y Vessey 2004; Bollman y Vessey 2006). Por el contrario Gan *et al.* (2004) en soja cultivada en un medio con  $\text{NO}_3^-$  no registro diferencias con el inoculado, sin embargo el experimento se desarrolló a concentraciones elevadas de N (10 mmolar). Fujikake *et al.* (2003) indicaron que el nitrato en el medio de crecimiento reduce el flujo de carbohidratos hacia los nódulos. El atrazo o el estancamiento del crecimiento por las plantas inoculadas coincide con lo observado a campo donde plantas inoculadas suelen presentar crecimientos iniciales inferiores a las plantas suministradas con fuentes inorgánicas, producto del mayor destino de carbohidratos hacia los nódulos de las raíces (Zapata *et al.* 1987). Este efecto se revierte con el transcurso de las etapas, como fue revelado por Giorda y Baigorri (1997) y Gutiérrez Boem *et al.* (2010). Buttery *et al.* (1992) y Salvagiotti *et al.* (2008) registraron bajas tasas de fijación de N atmosférico en los estados juveniles de plantas de soja. Zapata *et al.* (1987) en soja verifico que la fijación de N atmosférico, hasta R1 (Fehr y Caviness 1977) contribuye con el 21% del N total en planta, mientras el resto (77 %) proviene del N del suelo. La tasa de absorción de N atmosférico se incrementa en soja a partir de las etapas reproductivas, aproximadamente a los 55 DDS o R3, dependiendo del cultivar (Giorda y Baigorri 1997; Salvagiotti *et al.* 2008; Gonzalez y Raca 2012). En esta tesis las plantas inoculadas, como única fuente de N, no presentaron diferencia por pH, como tampoco incrementaron el crecimiento con el mayor número de días del tratamiento, por lo cual se atribuye a un estrés de N, como uno de los factores que limitó el crecimiento (Gulden y Vessey 1997, 1998). Esto también puede ser confirmado por la alta relación R/T que presentó el tratamiento inoculado. Fernandez 2011 y Lambers *et al.* (2009) sostuvieron que en los estados iniciales de las plantas la relación raíz-tallo es elevada (destina mayor recursos a la raíces) y este disminuye a medida que avanza el ciclo de crecimiento, a menos que sufra alguna privación de nutrientes o estrés, con lo cual persistiría la alta relación raíz-tallo. Por su parte Fernandez *et al.* (2011) ante deficiencias de P no encontraron diferencia en la relación raíz-tallo para girasol, maíz y soja.

### 3.4.2 Concentración de N en plantas

En el experimento II, el N total proveniente de la atmósfera fue insuficiente para optimizar el crecimiento de la planta estando próximo a  $10 \text{ mg g}^{-1}$  PS de planta (1,08 %) y debajo de los límites establecidos por Gulden y Vessey (1998); Bollman y Vessey (2006). En esta tesis la concentración de N en plantas con la fuente  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  fue del 3 %. Los bajos valores de N observados en las plantas inoculadas estarían relacionados a lo mencionado anteriormente sobre el período o ventana previo a la fijación atmosférica y a la limitación de N inorgánico en las etapas iniciales.

### 3.4.3 Efectos del N y del pH sobre la nodulación

Las plantas suministradas con N inorgánico presentaron una mayor nodulación (peso y número nódulos por planta) y crecimiento radical. Sin embargo, se verificó un efecto depresor sobre la nodulación específica a medida que avanzó el ciclo, registrando los valores más bajos al final y en los dos tratamientos. Similares resultados fueron registrados por Gulden y Vessey (1997) en poroto y Bullman y Vessey (2006) en arveja en combinaciones de inóculo más  $\text{N-NH}_4^+$  a concentraciones bajas. Este hecho sugiere que cada g de raíz mantendría una cantidad aproximada de nódulos (12,5 mg de nódulos por g raíz y/o 200 nódulos por g de raíz en peso seco) independientemente del tratamiento. Una mayor masa radical podría sustentar mayor nódulos por planta, como en el tratamiento de fuentes combinadas (Figura 3.3.8). Por otro lado, en las primeras etapas de crecimiento, el N inorgánico de la fuente combinada estaría afectando el peso total de nódulos y no el número de nódulos por g de raíz. Esto mismo fue detectado por Fujikake *et al.* (2003), quienes sostuvieron que la fuente de  $\text{NO}_3^-$  inhiben el desarrollo de los nódulos, sin embargo esta situación se revirtió cuando la fuente de N fue extraída del medio. Lucinski *et al.* (2002) y Bullman y Vessey (2006) también detectaron esta inhibición por  $\text{NO}_3^-$ . Por el contrario este último estaría produciendo un efecto estimulante en el crecimiento de la raíz. Algunos autores mencionan que pequeñas dosis con N inorgánico en etapas iniciales podrían estimular el crecimiento de la soja (Gulden y Vessey 1997; Gulden y Vessey 1998). Para esta tesis las plantas que fueron inoculadas como única fuente de N, no lograron equipararse con las que recibían el N inorgánico como única fuente a los 41 DDS. Mientras que el N inorgánico, en el tratamiento combinado, evita una deficiencia nutricional durante este bache de carencia de N, y promovería la liberación de nodulinas que favorecen a la nodulación (Glyan'ko *et al.* 2009).

### 3.4.4 Liberación de $\text{H}^+$ al medio de crecimiento

La acidificación y/o alcalinización rizosférica dependió del pH del medio donde crecieron las plantas. A pH 4,5 se observó una alcalinización del medio circundante a las raíces en todos los tratamientos de N excepto cuando la fuente de N fue el catión  $\text{NH}_4^+$ . En soja fue interesante el resultado de la interacción entre el pH y fuente de N y la acidificación causada por la fuente  $\text{NH}_4^+$  al pH ácido en el experimento 1. La soja posiblemente posee las ATP-asas adaptadas para funcionar en medios ácidos. Hawkins y Robbins (2010) observaron que plantas de soja no eran capaces de incrementar la actividad y/o concentración de ATP-asas localizadas en las membranas radicales cuando fueron tratadas con la fuente  $\text{NH}_4^+$  y pH ácidos a diferencia de las coníferas que si lo hacían. Yan *et al.* (1998) observaron una reducida actividad de las ATP-asas, en maíces a pH 3,5. En esta tesis el descenso de pH aún por debajo del pH del medio (4,5) afectó el crecimiento tanto aéreo como radical para el experimento 1. El tratamiento  $\text{NH}_4^+$  / pH 4,5 si se lo hubiera realizado en una solución de buffer alto, posiblemente esto no se habría detectado (reducción de biomasa radical y aérea) como fue citado por Imsande (1986). El tratamiento con  $\text{NH}_4^+$  / pH 4,5 afectó la morfología radical con una disminución en la LER y AER y un aumento en el diámetro promedio radical. Esto se dio como consecuencia de la muerte de las raíces más finas, producto de la acidez desencadenada en el medio, y quedando aquellas de mayor diámetro, similar a lo experimentado por Land y Kaiser (1994) en cebada y Vessey *et al.* (1990) en soja. A este mismo pH, esta situación no fue observada en plantas

tratadas con las fuentes  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{NO}_3^-$  e inoculada (Figura 3.3.9), sino se dio una alcalinización al medio. Esto fue consecuencia del gradiente de concentración de  $\text{H}^+$  del medio externo que fue mayor que el interno (Schubert *et al.* 1990; Durand y Bellon 1994; Hinsinger *et al.* 2003). Las plantas cultivadas con  $\text{NH}_4^+$  a pH 6,0 y 7,5 experimentaron un aumento de biomasa total con respecto al pH ácido. Esto estaría asociado a que la tasa de absorción del  $\text{NH}_4^+$  aumentaría a pH básicos, como fue detectado por Tolley y Raper (1986) en soja. Este aumento en la absorción posiblemente sea producto del menor gasto de energía en expulsar el  $\text{NH}_4^+$  del interior celular (Britto *et al.* 2001; Britto y Kronzucker 2006).

Las plantas cultivadas al pH 7,5 experimentaron una mínima liberación de  $\text{H}^+$  al medio en todas las fuentes de N ofrecidas. La menor acidez a pH alcalinos también fue observado por Durand y Bellon (1994) en plantas de maíz. Mientras que Durant *et al.* (2001) detectó que a pH alcalinos la mayor parte de los productos exudados por las plantas era consumido por las reacciones químicas del suelo y solo el 1% podría corresponder a mediciones de los  $\text{H}^+$  en la rizósfera.

### 3.5 CONCLUSIONES

El crecimiento de las plantas fue definido principalmente por la forma del suministro del N y no por el pH del medio. Las fuentes  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  y  $\text{NO}_3^-$  fueron las que promovieron la mayor acumulación de biomasa en los dos experimentos.

A diferencia de los parámetros de crecimiento, los resultados en los dos experimentos demostraron un mayor peso del pH del medio en la liberación de  $\text{H}^+$ . Es destacable el hecho que las plantas cultivadas con  $\text{NH}_4^+$  acidificaran la rizósfera en todos los rangos de pH. El efecto de la fuente de N se manifestó sólo en el nivel intermedio de pH (6,0) y respondió al ranking esperado, con una mayor acidificación de la fuente catiónica de N ( $\text{NH}_4^+$ ) y una menor acidificación en la fuente aniónica ( $\text{NO}_3^-$ ). Las plantas inoculadas en todos los casos presentaron una acidificación del medio similar a la fuente  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ .

Es interesante señalar que la liberación de  $\text{H}^+$  a pH ácidos y con la fuente  $\text{NH}_4^+$  se dio en soja y no en otras especies. Esto sería una característica adaptativa interesante y quizás una derivación indirecta del mejoramiento genético a que fue sometida la especie.



## **CAPÍTULO 4**

#### 4. DISCUSIÓN GENERAL

En esta tesis se evaluaron los efectos producidos por distintas formas de N y niveles de pH sobre los parámetros de crecimiento y el flujo de  $H^+$  en la rizosfera de las plantas de algodón girasol y soja. Las plantas se desarrollaron durante períodos de 33 y 41 días sobre medios hidropónicos. Las ventajas de este medio residen en que los tratamientos pueden ser suministrados con precisión y las raíces pueden ser cuantificadas en su totalidad, en contraste a lo que sucede en los suelos. Las plantas crecieron, en forma saludable y no mostraron síntomas de carencia o toxicidad de nutrientes. Se evaluaron tres fuentes de N: catiónica ( $NH_4^+$ ), aniónica ( $NO_3^-$ ) y combinada ( $NH_4NO_3$ ). En soja, se agregaron tratamientos de inoculación y combinación entre inóculo y fuente de N inorgánica. Todas estas fuentes se combinaron con los pH 4,5 – 6,0 y 7,5. Las tres especies se desarrollaron con un mismo protocolo de trabajo, cada solución de N fue constante (igual concentración) en las especies utilizadas.

En medio ácido (pH 4,5), las plantas alcalinizaron la rizósfera independientemente del tipo de fuente de N suministrada, con la excepción de las plantas de soja con la fuente  $NH_4^+$ . Esta alcalinización fue producto del flujo de  $H^+$  al interior celular (Figura 4.1). En el caso de las plantas cultivadas a pH 4,5 y con la fuente  $NO_3^-$ , los mecanismos asociados al ingreso de  $H^+$  a la célula pueden ser producidos por: 1- el equilibrio homeostático celular (symporter), por el cual ingresan dos  $H^+$  por cada anión  $NO_3^-$  [ $2H^+ = NO_3^-$ ], (Raven y Smith 1976; Marschner 1995; Hisinger *et al.* 2003); 2- el medio externo al ser de mayor acidez (concentración elevada de  $H^+$  en el medio) genera un gradiente con el ingreso de  $H^+$  al interior celular. Este último proceso estaría asociado a una mayor permeabilidad de la membrana plasmática de las raíces a pH ácidos, mencionado por Schubert *et al.* (1990); Tagliavini *et al.* (1995). Las ATP-asa estarían distorsionadas, no funcionales, ya que estas son el motor para la absorción de nutrientes (Zhu *et al.* 2009; Hawkins *et al.* 2010). Posiblemente con la fuente  $NO_3^-$  se dan estos 2 tipos de movimientos o mecanismos. En este caso también existiría una liberación de  $H^+$  hacia el medio externo a través de las ATP-asa, pero enmascarado por el mayor ingreso de  $H^+$  a la célula (Figura 4.1). Con la fuente  $NO_3NH_4$  estos mismos mecanismos descriptos sucederían de manera similar para las tres especies modelos (Figura 4.1). Algodón y girasol que fueron cultivadas sobre medios ácidos y con la fuente  $NH_4^+$ , el ingreso de  $H^+$  estaría asociado al mecanismo 2. Contrariamente, plantas de soja creciendo bajo esta misma combinación presentaron un mayor flujo de  $H^+$  hacia el medio externo, bajando aun más el pH del medio, es decir en sentido inverso a lo observado para las otras dos especies. Posiblemente la membrana plasmática donde se sitúan las ATP-asa, contaría con un mayor número de estas proteínas por unidad de membrana o una mayor actividad de cada una de estas proteínas (Hawkins y Robbins 2010). Finalmente, cuando las plantas de soja crecieron con inóculo, el flujo de  $H^+$  se dio con mayor intensidad hacia el interior celular, alcalinizando el medio, similar a lo registrado para la fuente  $NO_3^-$ , por un movimiento tipo 2 (Figura 4.1).

En medios de pH 6,0 y 7,5, las plantas de las tres especies presentaron una acidificación al medio rizosférico, independientemente a la fuente de N. La Figura 4.1 muestra que el flujo de  $H^+$  cambia de sentido en relación al pH ácido (flechas hacia la izquierda) indicando un mayor flujo hacia el medio externo. A pH 7,5 la acidificación registrada generalmente fue de una magnitud menor que al pH 6,0 sin embargo en la

mayoría de los tratamientos no se diferenciaron estadísticamente entre los dos pH superiores; salvo en soja en el Experimento 1 y

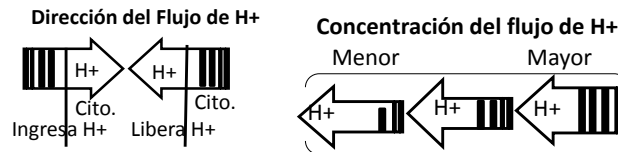
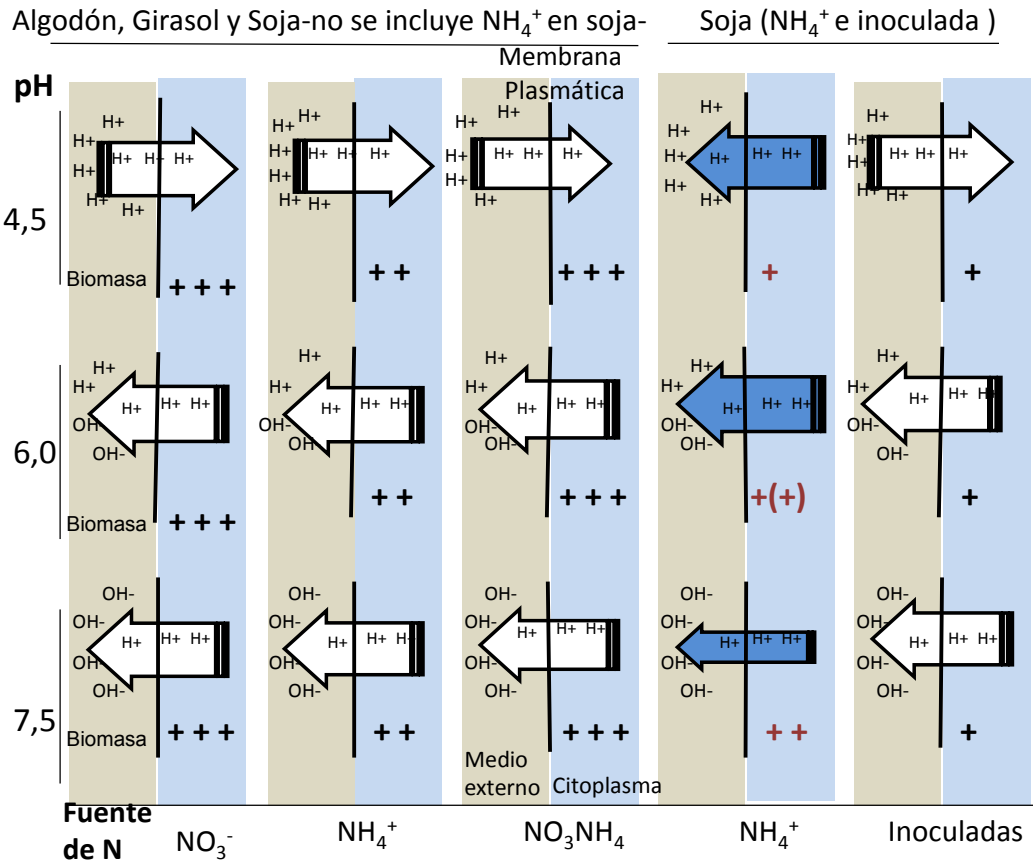


Figura 4.1. Modelo conceptual del flujo de  $\text{H}^+$  a nivel Membrana Plasmática. Plantas tratadas con las distintas formas de N y niveles de pH. Se indica el efecto de los tratamientos sobre la acumulación de biomasa total y los signos (+++) indican mayor biomasa producida y (+) la menor. La membrana plasmática separa el medio externo (apoplasto) del interno de la célula. Las flechas orientadas a la izquierda, o hacia el citosol indican un ingreso o absorción de  $\text{H}^+$ , mientras flechas a la derecha indican una salida o extrusión de  $\text{H}^+$ .

con la fuente  $\text{NH}_4^+$  (Figura 4.1), mientras en el experimento 2 se dio solo en algunos tratamientos. En el caso de la fuente  $\text{NH}_4^+$  a los pH 6,0 y 7,5 el flujo de  $\text{H}^+$  hacia el lado externo estaría vinculada al balance homeostático con la entrada de un  $\text{NH}_4^+$  y la salida de un  $\text{H}^+$ .

Las respuestas a los tratamientos sobre el crecimiento de las plantas presentaron un patrón distinto al experimentado por el flujo de  $\text{H}^+$ . El crecimiento fue regulado por la fuente de N, independientemente del pH, y solo en caso de la soja (experimento 1) fue afectado por la interacción. Las tres especies no mostraron síntomas de carencias o deficiencias nutricionales y experimentaron el mayor crecimiento con la fuente  $\text{NO}_3\text{NH}_4$  (Figura 4.1) coincidiendo con lo observado en otras especies (Marschner 1995; Hinsinger et al. 2003). En función de este resultados, se consideró a la fuente de N como referencia para cada especie evaluada y la figura 4.2 muestra los porcentajes (%) de reducción que experimentaron las especies bajo las distintas fuentes de N.

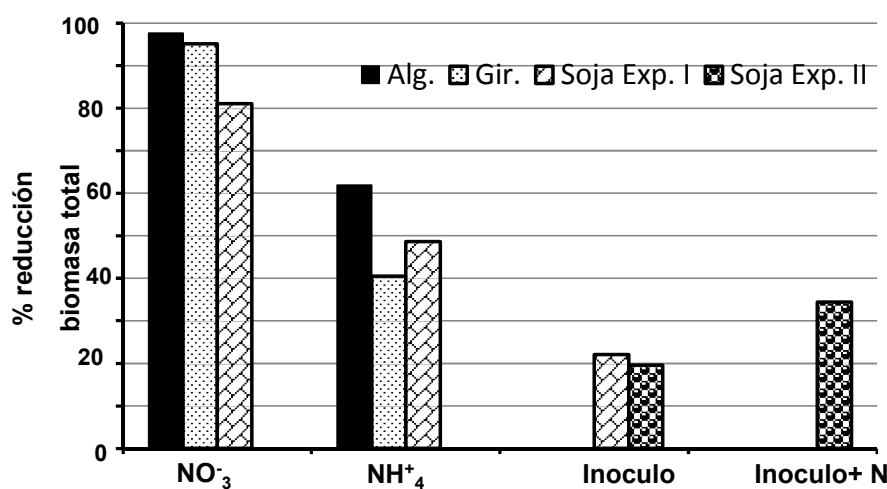


Figura 4.2 Porcentaje de reducción de biomasa total para algodón, girasol y soja (experimento I y experimento II) en relación a la fuente de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ .

Las plantas de soja presentaron la menor tasa de crecimiento cuando no fueron suministradas con N y solo dependieron de la fijación simbiótica para su nutrición nitrogenada (Figura 4.2).

Con la fuente  $\text{NO}_3^-$ , las tres especies experimentaron una reducción no significativa con respecto a la fuente  $\text{NO}_3\text{NH}_4$ . También se pudo constatar que las raíces de soja, con esta fuente, presentaron el menor diámetro con la mayor superficie de contacto o L.E.R (Figura 3.3.4). En girasol fue lo inverso, raíces de mayor diámetro presentaron menor L.E.R (Figura 2.3.2), o sea que existió una relación diámetro y L.E.R. Para la fuente  $\text{NH}_4^+$  el crecimiento que experimentaron las tres especies fue menor, y significativamente diferente a las otras dos fuentes. En algodón y en girasol, la concentración de N de los tejidos no presentó diferencias entre las fuentes. En soja la combinación de inoculo más N experimentó un aumento significativo de crecimiento con respecto al inoculado (Figura

3.3.5), pero significativamente menor a  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (Figura 4.2). Es así que dosis de concentración bajas de N y en los experimentos de esta tesis indicarían que el N estimula el crecimiento radical y nodular. Esto derivó en una relación significativa entre concentración de N total en planta (mg de N por planta) y la biomasa total (Figura 4.3) presentando el tratamiento combinado mayor biomasa en relación a las inoculadas únicamente.

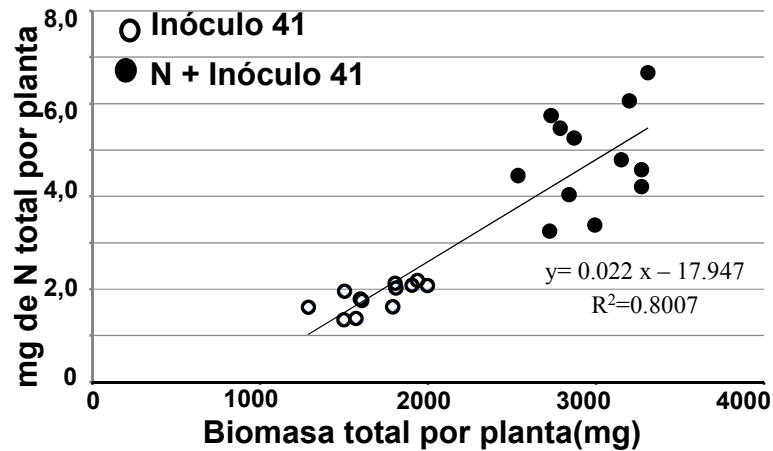


Figura 4.3 plantas de soja en el Experimento II, relación entre la biomasa total de la planta (mg) en función de N total acumulado hasta los 41 DDS.

En los experimentos de esta tesis fueron reunidas evidencias que permitieron verificar diversos mecanismos:

- Mecanismos de las raíces que tendieron a cambiar el patrón de absorción de los nutrientes de la solución nutritiva, promovidos por las diferentes tasa de absorción entre cationes-aniones, cuando fueron sometidos a diferentes pH del medio
- Situaciones en medio ácido y fuentes amoniacales ( $\text{NH}_4^+$ ) en la especie soja: la raíces presentarían una adaptación de la ATP-asa a ambientes ácidos.
- Situaciones de medios con pH 6,0 y 7,5: las especies reaccionaron con una acidificación al medio. Esto favoreció la disponibilidad de macronutrientes como P y algunos micronutrientes. También podría participar de la colonización de ciertos tipos de microorganismos del suelo.
- Las plantas de soja inoculadas, en esta tesis, presentaron una baja tasa de crecimiento cuando se las comparó con otras fuentes de N, sugiriendo que la fijación de N atmosférico fue baja, y habría limitado el crecimiento de las plantas juveniles. Esta especie experimento un estrés de N posiblemente por dos razones 1- la fijación se afianza luego de los 35-50 días con lo cual las etapas juveniles tendrían que ser cubiertas por una mínima cantidad de N mineral del medio y 2- se observó que el N del medio, estimula tanto el crecimiento radical como nodular y es reflejado en la acumulación de la biomasa total (Figura 4.3).

#### 4.1 Contrastación de Hipótesis

El objetivo general de esta tesis fue analizar el efecto del pH del medio y la fuente de N y su interacción sobre las variables de crecimiento y la liberación de  $\text{H}^+$  en la rizósfera de las especies de algodón, girasol y soja.

Como hipótesis general se propuso que el pH del medio es más importante que la fuente de N en el flujo de  $\text{H}^+$  de la rizósfera de las especies estudiadas. En consecuencia se concluye que las tres especies de plantas, a nivel rizósfera, el pH resulto ser más importante que la fuente de N (salvo en soja con la fuente  $\text{NH}_4^+$ ), por lo cual se acepta la hipótesis propuesta.

Para responder a los objetivos e hipótesis en el capítulo 2 se evaluó a plantas de algodón y girasol y en el capítulo 3 a soja. El objetivo del Capítulo 2 fue evaluar el efecto combinado del pH y la fuente de N del medio sobre el crecimiento, morfología radical y la liberación de  $\text{H}^+$  en la rizósfera de las plantas de algodón y girasol. La hipótesis 1 planteaba que existe interacción entre los factores fuente de N y pH del medio al menos para alguna de las variables de crecimiento, morfología radical y contenido de N. Los resultados permiten aceptar esta hipótesis. Las mediciones realizadas en plantas de girasol y algodón indicaron que el factor N fue el más importante para los parámetros de crecimiento en las dos especies. Sin embargo la concentración de N y una de las variables de morfología radical (ART) en girasol presento efecto interactivo. En algodón se encontró interacción para la relación R-T.

La hipótesis 2 de este capítulo planteaba que las raíces de las plantas de algodón y girasol cuando crecen en medios ácidos producen una alcalinización rizosférica, por el

contrario cuando el crecimiento se da en medios alcalinos acidifican a la rizósfera. Se acepta la hipótesis, ya que el flujo de  $H^+$  dependió del pH del medio de crecimiento.

El objetivo del Capítulo 3 fue evaluar el efecto combinado del pH del medio y la fuente de N (incluyendo la fijación simbiótica) sobre los parámetros de crecimiento, acumulación de N y la liberación de  $H^+$  en la rizósfera de plantas de soja. Las hipótesis 1 planteaba que existe interacción entre fuente de N y pH para acumulación de biomasa, morfología radical y contenido de N. Los resultados encontrados indican que los parámetros de crecimiento presentaron interacción por lo tanto no se rechaza la hipótesis propuesta. La segunda hipótesis planteaba que no existe interacción entre los factores fuente de N y pH de medio sobre la liberación de  $H^+$  en plantas de soja. En los experimento 1 y 2 se verificó que la liberación de  $H^+$  fue afectada por la interacción entre los factores principales por lo tanto se rechaza la hipótesis propuesta.

#### 4.2 Aportes más sobresalientes de esta tesis

*Comparación entre especies:* las tres especies tuvieron una tendencia similar, en cuanto al crecimiento para distintas fuentes de N. Lógicamente, este comportamiento no fue del todo igual en las especies estudiadas, ya que tuvieron un % de reducción diferente para cada fuentes de N. El algodón fue el que resultó menos afectado por la fuente N (Figura 4.2), mientras que la soja y girasol presentaron las mayores reducciones en biomasa.

*Comparación a nivel fuente de N:* las distintas fuentes analizadas para el crecimiento en las tres especies, siguieron el mismo patrón o ranking y en el orden de  $NH_4NO_3$ ,  $NO_3^-$ ,  $NH_4^+$ , N + inóculo y por último las inoculadas solamente.

*Comparación de niveles de pH del medio:* en girasol y algodón el crecimiento no fue afectado por el pH. Sin embargo la soja resultó afectada, principalmente por los pH ácidos y la fuente  $NH_4^+$ .

*Liberación de protones a la rizósfera:* experimentos realizados ad hoc donde se analizaron tres especies y la interacción pH x N sobre la liberación de  $H^+$  en la rizósfera se demostró que ambos factores actuaron independientemente, con un amplio predominio de interacciones no significativas.

El conocimiento de una mayor información relacionada a la parte aérea con respecto al suelo y principalmente a las interacciones suelo – planta permiten que esta tesis sea un aporte más hacia el conocimiento del ambiente rizosférico

#### 4.3 Líneas de investigación que surgen de los resultados de esta tesis

El desarrollo de esta tesis permitió indagar y generar nuevos aportes a la ciencia relacionada con la relación planta-suelo principalmente a escala rizosférica. En el transcurso del experimento surgieron ideas y preguntas sin resolver para futuras líneas de investigación:

Caracterización de los compuestos liberados a la rizósfera, especialmente por las leguminosas ya que estos actúan como quimio-atractores o repelentes de bacterias.

Estudios relacionados con la liberación de  $H^+$  al medio durante las horas de luz del día y sus relaciones con el crecimiento (biomasa total) diario. Altas tasas de acidificación presentan las mayores tasas de crecimiento como fue mencionado por Tang *et al.* (1997). En nuestros ensayos se observó que las mayores tasas de liberación de  $H^+$  se producían entre la 11 y 16 hs, quizás relacionadas con la máxima actividad del aparato fotosintético

durante esas horas. Por lo tanto sería necesario realizar evaluaciones para indagar las relaciones entre liberación de  $H^+$  y tasa de crecimiento del cultivo acotada para esas horas mencionadas.

Screening mediante la metodología utilizada en esta tesis, para determinar plantas tolerantes a medios ácidos y/o alcalinos en las cuales se podría hacer estudios intraespecíficos.

Mejoramiento que pueden experimentar las especies en ambientes ácidos, mediante evaluaciones bioquímicas de las proteínas ATP-asa situadas en las MP de las raíces.

En el experimento I las plantas de soja con la fuente  $NO_3^-$  presentaron valores bajos en la relación raíz-tallo (Figura 3.3.1) a diferencia de las restantes fuentes de N que no la presentaron. Sin embargo esta fuente se vio favorecida por una alta longitud específica (LER) y área específica radical (AER), convirtiéndola en una especie de mayor eficiencia frente a esta fuente. Sin embargo es necesario pruebas complementarias para confirmar este efecto.

La metodología empleada en esta tesis y con estas especies, sería necesario de pruebas complementarias llevadas a cabo en macetas y a campo, para extrapolar los resultados obtenidos. En el caso de liberación de  $H^+$ , se podría combinar maceta que incluye suelo, agar y colorante para observar los contrastes dados por flujo de  $H^+$  en la rizósfera de las plantas.



## 5 BIBLIOGRAFIA

- Aguilar A, Van Diest A (1981) Rock phosphate mobilization induced by the alkaline uptake pattern of legumes utilizing symbiotically fixed nitrogen. *Plant and Soil* 61, 27-42.
- Alcántara E, De La Guardia MD (1991) Variability on sunflower inbred lines to iron deficiency stress. *Plant and Soil* 130: 93-96.
- Alkama N, Ounane G, Drevon J (2012) Is genotypic variation of H<sup>+</sup> efflux under P deficiency linked with nodulated-root respiration of N<sub>2</sub> – fixing common-bean (*Phaseolus vulgaris* L.)?. *Journal of Plant Physiology*. 169:1084-1089.
- Allen S, Raven JA (1987) Intracellular pH regulation in *Ricinus communis* grown with ammonium or nitrate as N source: The role of long distance transport. *Journal of Experimental Botany* 38: 580-596
- Andrade FH, Sadras VO (2002) Bases para el manejo del maíz, el girasol y la soja. Ed. E.E.A. INTA Balcarce-F.C.A. U.N.M.P. pp 57-96
- Babourina O, Voltchanskii K, McGann B, Newman I, Rengel Z (2007) Nitrate supply affects ammonium transport in canola roots. *Journal of Experimental Botany* 58: 651-658
- Baethgen WE, Alley MM (1989) A manual colorimetric procedure for measuring ammonium nitrogen in soil and plant Kjeldahl digest. *Communication in Soil Science and Plant Analysis* 20: 961-969

- Bar-Yosef H (1991) Root excretions and their environmental effects: Influence on availability of phosphorus. En Eds. Waisel Y, Eshel A y Kafkafi U. Plant roots: The hidden half. Marcel Dekker, New York. pp. 581-605.
- Bertin C, Yang X, Weston L (2003) The role of root exudates and allelochemicals in the rhizosphere. *Plant and Soil* 256: 67-83.
- Bloom A, Meyerhoff P, Taylor A, Rost T (2003) Root development and absorption of ammonium and nitrate from the rhizosphere. *Journal Plant Growth Regulation* 21:416-431
- Bollman M, Vessey K (2006) Differential effects of nitrate and ammonium supply on nodule initiation, development, and distribution on roots of pea (*Pisum sativum*). *Canadian Journal Botany* 84:893-903
- Britto D, Kronzucker H (2002)  $\text{NH}_4^+$  toxicity in higher plants: a critical review. *Journal Plant Physiology* 159: 567-584.
- Britto D, Kronzucker H (2005) Nitrogen acquisition, PEP carboxylase, and cellular pH homeostasis: new views on old paradigms. *Plant, Cell and Environment*. 28: 1396–1409
- Britto D, Kronzucker H (2006) Futile cycling at the plasma membrane: a hallmark of low-affinity nutrient transport. *Trends in Plant Science*. 11: 529-534
- Britto D, Siddiqi M, Glass A, Kronzucker H (2001) Futile transmembrane  $\text{NH}_4^+$  cycling: A cellular hypothesis to explain ammonium toxicity in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 98:4255-4258

- Brix H, Dyhr-Jensen K, Lorenzen B (2002) Root-zone acidity and nitrogen source affects *Typha latifolia* L. growth and uptake kinetics of ammonium and nitrate. *Journal of Experimental Botany* 53: 2441-2450.
- Brouder SM, Cassman KG (1990) Root development of two cotton cultivars in relation to potassium uptake and plant growth in a vermiculitic soil. *Field Crops Research* 23: 187-203
- Buttery BR, Park SJ, Hume DJ (1992) Potential for increasing nitrogen fixation in grain legumes. *Candiense Journal Plant Science* 72: 323-349
- Calvaruso C, N'Dira V, Turapul M (2011) Impact of common European tree species and Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii* [Mirb.] Franco) on the physicochemical properties of the rhizosphere. *Plant and Soil* 342: 469–480
- Cakmak I, Marschner H (1990) Decrease in nitrate uptake and increase in proton release in zinc deficient cotton, sunflower and buckwheat plants. *Plant and Soil* 129: 261-268
- Carmi A, Shalhevet J (1983) Root effect on cotton growth and yield. *Crop Science* 23:875-878
- Cawthray G (2003) An improved reversed-phase liquid chromatographic method for the analysis of low-molecular mass organic acids in plant root exudates. *Journal of Chromatography A* 1011: 233-240.
- Chaignon V, Bedin F, Hinsinger P (2002) Copper bioavailability and rhizosphere pH changes as affected by nitrogen supply for tomato and oilseed rape cropped on an acidic and a calcareous soil. *Plant and Soil* 243:2:12.

- Chaillou S, Morot-Gaudry J, Salsac L, Lesaint C, Jolivet E (1986) Compared effects of  $\text{NO}_3^-$  or  $\text{NH}_4^+$  on growth and metabolism of French bean. *Physiology Vegetal* 24:679-687.
- Chen Y, Barak P (1982) Iron nutrition of plants in calcareous soils. *Advances in Agronomy* 35: 217-240.
- Chen G, Guo S, Kronzucker H, Shi W (2013) Nitrogen use efficiency (NUE) in rice links to  $\text{NH}_4^+$  toxicity and futile  $\text{NH}_4^+$  cycling in roots. *Plant Soil* 369:351–363
- Coventry D R, Slaterry W J (1991) Acidification of soil associated with lupins grown in a crop rotation in north-eastern Victoria. *Australian Journal of Agricultural Research* 42: 391-397.
- Cramer M, Lewis O (1993) The influence of  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{NH}_4^+$  nutrition on the gas exchange characteristics of the roots of wheat (*Triticum aestivum*) and maize (*Zea mays*) plants. *Annals of Botany* 73: 37-46
- Darrah PR (1993) The rhizosphere and plant nutrition: a quantitative approach. *Plant and Soil* 155/156: 1-20
- Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW (2010) InfoStat. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina
- Doddema H, Telkamp G (1979) Uptake of nitrate by mutants of *Arabidopsis thaliana*, disturbed in uptake or reduction of nitrate. *Physiology Plant* 46: 332-338

- Durand R, Bellon N (1994) The influence of the growth media and mineral nutrition on corn root hydrogen/bicarbonate releases and rhizosphere pH. *Journal of Plant Nutrition* 17: 817-838.
- Durand R, Bellon N, Jaillard B (2001) Determining the net flux of charge released by maize roots by directly measuring variations of the alkalinity in the nutrient solution. *Plant and Soil* 229: 305-318
- Faggioli V (2008) Efecto de la soja, girasol y maíz sobre el pH y fracciones de fósforo de la rizósfera. Tesis de Magíster en la Universidad de Buenos Aires, área ciencia del suelo, orientación fertilidad de suelos. Escuela para graduados Alberto Soriano.
- Fei H, Vessey J (2004) Further investigation of the roles of auxin and cytokinin in the  $\text{NH}_4^+$  induced stimulation of nodulation using white clover transformed with the auxin-sensitive reporter GH3:gusA. *Physiologia Plantarum* 121:674-681
- Fehr W R, Caviness C E (1977) Stages of Soybean Development. Special report 80. Iowa State University, Ames, IO.
- Fernández MC, Belinque H, Gutierrez Boem FH, Rubio G (2009) Compared phosphorus efficiency in soybean, sunflower and maize. *Journal of Plant Nutrition* 32: 2027-2043
- Fernández M F (2011) Eficiencia en la adquisición de fósforo en cultivos de soja, girasol y maíz. Tesis de Doctor de la Universidad de Buenos Aires, Área Ciencias Agropecuarias. Escuela para Graduados Alberto Soriano

- Frageria N, Stone L (2006) Physical, chemical, and biological changes in the rhizosphere and nutrient availability. *Journal of Plant Nutrition* 29: 1327-1356.
- Fujikake H, Yamazaki A, Ohtake N, Sueyoshi K, Matsushashi S, Ito T, Mizuniwa C, Kume T, Hashimoto S, Ishioka N, Watanabe S, Osa A, Sekine T, Uchida H, Tsuji A, Ohyama T (2003) Quick and reversible inhibition of soybean root nodule growth by nitrate involves a decrease in sucrose supply to nodules. *Journal of Experimental Botany* 54: 1379-1388
- Gahoonia TS, Nielsen NE (1992) The effect of root-induced pH changes on the depletion of inorganic and organic phosphorus in the rhizosphere. *Plant and Soil* 143: 185-191.
- Gahoonia TS, Nielsen NE (2004) Root traits as tools for creating phosphorus efficient crop varieties. *Plant and Soil* 206: 47-57.
- Gan Y, Stulen I, van Keulen H, Kuiper P (2004) Low concentrations of nitrate and ammonium stimulate nodulation and N<sub>2</sub> fixation while inhibiting specific nodulation (nodule DW g<sup>-1</sup> root dry weight) in soybean. *Plant and Soil* 258:281-292
- Gerendás J, Ratcliffe RG, Sattelmacher B (1990) <sup>31</sup>P nuclear magnetic resonance evidence for differences in intracellular pH in the roots of maize seedlings grown with nitrate or ammonium. *Journal of Plant Physiology* 137:125-128
- Gerke J, Beißner L, Römer W (2000 a) The quantitative effect of chemical phosphate mobilization by carboxylate anions on P uptake by a single root. I. The basic concept and determination of soil parameters. *Journal Plant Nutrition Soil Science* 163: 207-212

- Gerke J, Römer W, Beißner L (2000 b) The quantitative effect of chemical phosphate mobilization by carboxylate anions on P uptake by a single root. II. The importance of soil and plant parameters for uptake of mobilized P. *Journal Plant Nutrition Soil Science* 163: 213-219
- Gioda L, y Baigorri H (1997) El cultivo de la soja en Argentina. INTA Centro Regional Córdoba - EEA Mamfredi.
- Glass A, Siddiqi M (1984) The control of nutrient uptake rate in relation to the inorganic composition of plants. *Advance Plant Nutrition* 1: 103-147
- Glyan'ko A, Vasil'eva G, Mitanova N, Ishchenko A (2009) The influence of mineral nitrogen on legume-rhizobium symbiosis. *Plant Physiology* 36:250-258
- González N, Racca R (2012) Fijación biológica de nitrógeno en soja. El cultivo de soja en Argentina. *ISBN*, 987-27584.
- Gregory P, Hinsinger P (1999) New approaches to studying chemical and physical changes in the rhizosphere: an overview. *Plant and Soil* 211: 1-9.
- Guivarch A, Hinsinger P, Staunton S (1999) Root uptake and distribution of radiocaesium from contaminated soil and the enhancement of Cs adsorption in the rhizosphere. *Plant and Soil* 211: 131-138.
- Gulden R, Vessey K (1997) The stimulating effect of ammonium on nodulation in *Pisum sativum* L. is not long once ammonium supply is discontinued. *Plant and soil* 195: 198-205.

- Gulden R, Vessey K (1998) Low concentrations of ammonium inhibit specific nodulation (nodule number g<sup>-1</sup> root DW) in soybean (*Glycine max* Merr.). *Plant and Soil* 198: 127-136
- Gutiérrez Boem F (2007) Fertilización en soja. Fertilización de cultivos de granos y pasturas, diagnóstico y recomendación en la región Pampeana. Editorial Facultad de Agronomía, 2 edición.
- Hartung W, Leport L, Ratcliffe RG, Sauter A, Duda R, Turner NC (2002) Absciscic acid concentration, root pH and anatomy do not explain growth differences of chickpea (*Cicer arietinum* L.) and lupin (*Lupinus angustifolius* L.) on acid and alkaline soils. *Plant and Soil* 240: 191–199
- Hawkins B, Robbins S (2010) pH affects ammonium, nitrate and proton fluxes in the apical region of conifer and soybean roots. *Physiologia Plantarum* 138: 238-247
- Hawkins B, BoukcimH, Plassard C (2008) A comparison of ammonium, nitrate and proton net fluxes along seedling roots of Douglas-fir and lodgepole pine grown and measured with different inorganic nitrogen sources. *Plant, Cell and Environment* 31: 278-287
- Haynes RJ (1990) Active ion uptake and maintenance of cation-anion balance: A critical examination of their role in regulating rhizosphere pH. *Plant and Soil* 126: 247-267.
- Haynes R, Goh K (1978) Ammonium and nitrate nutrition of plants. *Biology review*. 53: 465-510



- Heberer J, Below F (1989) Mixed nitrogen nutrition and productivity of wheat grown in hydroponics. *Annals of Botany*. 63: 643-649
- Heim A (2001) Aluminium resistance of Norway spruce: Root exudation versus immobilisation in roots. *Plant and Soil* 92: 450,-451.
- Henriksen G, Raman D, Walker L, Spanswick R (1992) Measurement of net fluxes of ammonium and nitrate at the surface of Barley root using ion-selective microelectrodes. *Plant Physiology* 99: 734-747
- Hylander L, Ae N, Hatta T, Sugiyama M (1999) Exploitation of K near roots of cotton, maize, upland rice, and soybean grown in an Ultisol. *Plant and Soil* 208: 33-41
- Hinsinger P (2001) Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. *Plant and Soil* 237: 173-195.
- Hinsinger P, Bengough G, Vetterlein D, Young I (2009) Rhizosphere: biophysics, biogeochemistry and ecological relevance. *Plant and Soil* 321: 117-152.
- Hinsinger P, Plassard C, Tang C, Jaillard B (2003) Origins of root-mediated pH changes in the rhizosphere and their responses to environmental constraints: A review. *Plant and Soil* 248: 43-59
- Hoffland E (1992) Quantitative evaluation of the role of organic acid exudation in the mobilization of rock phosphate by rape. *Plant and Soil*. 140: 279-289
- Imas P, Bar-Yosef B, Kafkafi U, Ganmore-Neumann R (1997) Phosphate induced carboxylate and proton release by tomato roots. *Plant and Soil* 191: 35-39.

- Imsande J (1986) Nitrate-ammonium ratio required for pH homeostasis in hydroponically grown soybean. *Journal of Experimental Botany* 176: 341-347.
- Israel D, Jackson W (1982) Ion balance, uptake, and transport processes in N<sub>2</sub> fixing and nitrate- and urea-dependent soybean plant. *Plant Physiology* 69: 171-178
- Jones D L (1998) Organic acids in the rhizosphere – a critical review. *Plant and Soil* 205: 25-44.
- Jones D L, Nguyen C, Finlay R D (2009) Carbon flow in the rhizosphere: carbon trading at the soil–root interface. *Plant and Soil* 321: 5–33.
- Kirkby E A, Knight A H (1977) Influence of the level of nitrate nutrition on ion uptake and assimilation, organic acid accumulation, and cation-anion balance in whole tomato plants. *Plant Physiology* 60: 349-353.
- Kirkby E A, Mengel K (1967) Ionic balance in different tissues of the tomato plant in relation to nitrate, urea, or ammonium nutrition. *Plant Physiology* 42: 6-14.
- Lambers H, Shane MW, Cramer MD, Pearse SJ, Veneklaas EJ (2006) Root structure and functioning for efficient acquisition of phosphorus: matching morphological and physiological traits. *Annals of Botany* 98: 693–713
- Lambers H, Mougel C, Jaillard B, Hinsinger P (2009) Plant-microbe-soil interactions in the rhizosphere: an evolutionary perspective. *Plant and Soil* 321: 83–115
- Lang B, Kaiser W (1994) Solute content and energy status of roots of barley plants cultivated at different pH on nitrate- or ammonium-nitrogen. *New Phytology* 128: 451-459

- Leidi EO, Silberbush M, Soares MIM, Lips SH (1992) Salinity and nitrogen nutrition studies on peanut and cotton plants. *Journal of Plant Nutrition* 15: 591-604
- LiuY, Mi G, Chen F, Zhang J, Zhang F (2004) Rhizosphere effect and root growth of two maize (*Zea mays* L.) genotypes with contrasting P efficiency at low P availability. *Plant Science* 167: 217-223.
- Lomas J, Mandel M, Zemel, Z. (1977). The effect of climate on irrigated cotton yields under semi-arid conditions: Temperature-yield relationships. *Agricultural Meteorology*, 18:, 435-453.
- Lucinski R, Polcyn W, Ratajczak L (2002) Nitrate reduction and nitrogen fixation in symbiotic association. *Acta Biochimica Polonica* 49: 537-546
- Ludewig U, von Wiren N, Frommer W (2002) Uniport of  $\text{NH}_4^+$  by the root hair plasma membrane ammonium transporter LeAMT1;1. *The Journal of Biological Chemistry* 277: 13548-13555.
- Marschner H (1995) Mineral nutrition of higher plants. 2nd ed. Academic Press, London, pp 889.
- Miller A, Cramer M (2004) Root nitrogen acquisition and assimilation. *Plant and Soil* 274: 1-36.
- Neumann G, Massonneau A, Martinoia E, Römheld V (1999) Physiological adaptations to phosphorus deficiency during proteoid root development in white lupin. *Planta* 208: 373-382.

- Nguyen C, Todorovic C, Robin C, Christophe A, Guckert A (1999) Continuous monitoring of rhizosphere respiration after labelling of plant shoots with  $^{14}\text{CO}_2$ . *Plant and Soil* 212: 191-201.
- Nyatsanga T, Pierre WH (1973) Effect of nitrogen fixation by legumes on soil acidity. *Agronomy Journal* 65: 936-940.
- Nye P (1981) Changes of pH across the rhizosphere induced by roots. *Plant and Soil* 61: 7-26.
- Ohwaki Y, Sugahara K (1997) Active extrusion of protons and exudation of carboxylic acids in response to iron deficiency by roots of chickpea (*Cicer arietinum* L.) *Plant and Soil* 189:49–55
- Ohwaki Y, Hirata H (1992) Differences in carboxylic acid exudation among p-starved leguminous crops in relation to carboxylic acid contents in plant tissues and phospholipid level in roots. *Soil Science and Plant Nutrition* 38: 235-243
- Palmgren M, Harper J (1999) Pumping with plant P-type ATP-ases. *Journal of Experimental Botany* 50: 883-893
- Palmgren MG (2001) Plant plasma membrane  $\text{H}^+$  ATP-ases: power houses for nutrient uptake. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 52:817–45
- Parker M, Harris H (1977) Yield and leaf nitrogen of nodulating and non-nodulating soybeans as affected by nitrogen and molybdenum. *Agronomy Journal* 69:551-554.

- Pellet D, Grunes D, Kochian L (1995) Organic acid exudation as an aluminium-tolerance mechanism in maize (*Zea mays* L.). *Planta* 196: 788-795.
- Petersen W, Böttger M (1991) Contribution of organic acids to the acidification of the rhizosphere of maize seedlings. *Plant and Soil* 132: 159-163.
- Peuke A, Tischner R (1991) Nitrate uptake and reduction of aseptically cultivated Spruce seedlings, *Picea abies* (L.) Karst. *Journal Experimental Botany* 42: 723-728
- Plassard C, Meslem M, Souche G, Jaillard B (1999) Localization and quantification of net fluxes of  $H^+$  along maize roots by combined use of pH-indicator dye videodensitometry and  $H^+$  selective microelectrodes. *Plant and Soil* 211: 29-39
- Plieth C, Sattelmacher B, Knight MG (2000) Ammonium uptake and cellular alkalinisation in roots of *Arabidopsis thaliana*: The involvement of cytoplasmic calcium. *Physiologia plantarum* 110: 518 – 523.
- Purcell L, King C (1996) Drought and nitrogen source effects on nitrogen nutrition, seed growth, and yield in soybean. *Journal Plant Nutrition* 19:969-993
- Raghothama KG (1999) Phosphate acquisition. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50: 665-693
- Ramani S, Kannan S (1982) Inadaptive changes in pH with Zn-stress tolerance in some cultivars of cotton and peanut. *Journal Plant Nutrition* 5: 207-2017
- Raven J, Smith F (1976) Nitrogen assimilation and transport in vascular land plants in relation to intracellular pH regulation. *New Phytologist* 76: 415-431
- Raven J. (1990) Sensing pH. *Plant, Cell and Environment* 13: 721-729

- Richardson A, Barea J, McNeill AM, Prigent-Combaret C (2009) Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant and Soil* 321: 305–339
- Riley D, Barber SA (1971) Ammonium and nitrate fertilization and phosphorus uptake. *Soil Science American Proceedings* 35: 301-306
- Römheld V, Müller C, Marschner H (1984) Localization and capacity of proton pumps in root of intact sunflower plants. *Plant Physiology* 76: 603-606
- Römheld V (1986) Variaciones en el pH de la rizósfera de varias especies de plantas cultivadas en función de las aplicaciones de elementos nutritivos. *Revista de la Potasa, comunicaciones mensuales del Instituto de la Potasa, Berna (Suiza)* 12: 1-5.
- Ruan J, Gerendas J, Hardter R, Sattelmacher B (2007) Effect of nitrogen form and root-zone pH on growth and nitrogen uptake of Tea (*Camellia sinensis*) Plants. *Annals of Botany* 99: 301-310
- Rubio G, Liao H, Yan X, Lynch JP (2003) Topsoil foraging and its role in plant competitiveness for phosphorus in common bean. *Crop Science* 43: 598–607.
- Ryan PR, Delhaize E, Jones DL (2001) Function and mechanism of organic anion selected areas of rhizosphere research on P acquisition. *Australian Journal Soil Research* 41: 471-499.
- Salvagiotti F, Cassman K, Specht J, Walters D, Weiss A, Dobermann A (2008) Nitrogen uptake, fixation and response to fertilizer N in soybean: A review. *Field Crops Research* 108:1-13

- Salvagiotti F, Specht J, Cassman G, Walters D, Weiss A, Dobermann A (2009) Growth and nitrogen fixation in high-yielding soybean: impact of nitrogen fertilization. *Agronomy Journal* 101:958-970.
- Sas L, Rengel Z, Tang C (2002) The effect of nitrogen nutrition on cluster root formation and proton extrusion by *Lupinus albus*. *Annals of Botany* 89:435-442
- Schaller G (1987) pH changes in the rhizosphere in relation to the pH-buffering of soils. *Plant and Soil* 97: 439-444.
- Schortemeyer M, Feil B, Stamp P (1993) Root morphology and nitrogen uptake of maize simultaneously supplied with ammonium and nitrate in a split-root system. *Annals of Botany* 72: 107-115.
- Shubert S, Shubert E, Mengel K (1990) Effect of low pH of the root medium on proton release, growth, and nutrient uptake of field beans (*Vicia faba*). *Plant and Soil* 124:239-244.
- Smirnoff N, Todd P, Stewart GR (1984) The Occurrence of Nitrate Reduction in the Leaves of Woody Plants. *Annal Botany* 54: 363-374
- Smith FA, Raven JA (1976) H<sup>+</sup> transport and regulation of cell pH. *Transport in plant II*. *Encyclopedia of plant physiology*. Ed. Lüttge y Pitman 2: 314-346
- Ström L, Olsson T, Tyler G (1996) Differences between calcifuge and acidifuge plants in root exudation of low-molecular organic acids. *Plant and Soil* 167: 239-245
- Sze H, Li X, Palmgren M (1999) Energization of plant cell membranes by H<sup>+</sup> pumping ATPases : regulation and biosynthesis. *The Plant Cell* 11: 677-689

- Tagliavini M, Masia A, Quartieri M (1995) Bulk soil pH rhizosphere pH of peach trees in calcareous and alkaline soils as affected by the form of nitrogen fertilizers. *Plant and Soil* 176: 263-271.
- Tang C, McLay C, Barton L (1997) A comparison of proton excretion of twelve pasture legumes grown in nutrient solution. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 37:563-570.
- Tang C, Hinsinger P, Jaillard B, Rengel Z, Drevon J (2001) Effect of phosphorus deficiency on the growth, symbiotic N<sub>2</sub> fixation and proton release by two bean (*Phaseolus vulgaris*) genotypes. *Agronomie* 21: 683-689
- Tang C, Drevon JJ, Jaillard B, Souche G, Hinsinger P (2004) Proton release of two genotypes of bean (*Phaseolus vulgaris*L.) as affected by N nutrition and P deficiency. *Plant and Soil* 260: 59–68
- Tang C, Han HZ, Qiao YF, Zheng SJ (2009) Phosphorus deficiency does not enhance proton release by roots of soybean [*Glycine max* (L.) Murr.]. *Environmental and Experimental Botany* 67: 228-234
- Taylor A, Bloom A (1998) Ammonium, nitrate, and proton fluxes along the maize root. *Plant, Cell and Environment* 21: 1255-1263
- Thomson C J, Marschner H, Römheld V (1993) Effect of nitrogen fertilizer form on pH of the bulk soil and rhizosphere, and on the growth, phosphorus, and micronutrient uptake of soybean. *Journal Plant Nutrition* 16: 493-506.



- Tolley-Henry L, Raper D (1986) Utilization ammonium as a nitrogen source. *Plant Physiology* 82: 56-60.
- Trolove SN, Hedley MJ, Kirk GJ, Bolan NS, Loganathan P (2003) Progress in exudation from plant roots. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52: 527-560.
- Van Beusichem M, Kirkby E, Baas R (1988) Influence of nitrate and ammonium nutrition on the uptake, assimilation, and distribution of nutrients in *Ricinus communis*. *Plant Physiology* 86: 914-921
- Vessey K, Henry L, Chaillou S, Raper D (1990) Root-zone acidity affect relative uptake of nitrate and ammonium from mixed nitrogen sources. *Journal of Plant Nutrition* 13: 95-116
- Vollbrecht P, Klein E, Kasemir H (1989) Different effects of supplied ammonium on glutamine synthetase activity in mustard (*Sinapis alba*) and (*Pinus sylvestris*) seedlings. *Physiology Plant* 77: 129-135
- Wang MY, Siddiqi MY, Ruth TJ, Class ADM (1993) Ammonium uptake by rice roots: II kinetics of  $^{13}\text{NH}_4^+$  influx across the plasmalemma. *Plant Physiology* 103: 1259-1267
- Wang X, Tang C, Guppy CN, Sale PWG (2008) Phosphorus acquisition characteristics of cotton (*Gossypium hirsutum* L.), wheat (*Triticum aestivum* L.) and white lupin (*Lupinus albus* L.) under P deficient conditions. *Plant and Soil* 312: 117-128

- Weissman GS (1972) Influence of ammonium and nitrate nutrition on enzymatic activity in soybean and sunflower. *Plant Physiology* 49: 138-141
- Woolhouse HW, Hardwick K (1966) The growth of tomato seedlings in relation to the form of the nitrogen supply. *New Phytologist* 65: 518– 526
- Wouterlood M, Cawthray GR, Turner S, LambersH, Veneklaas EJ (2004) Rhizosphere carboxylate concentrations of chickpea are affected by genotype and soil type. *Plant and Soil* 261: 1–10
- Yadav R, Tarafdar J (2001) Influence of organic and inorganic phosphorus supply on the maximum secretion of acid phosphatase by plants. *Biology and fertility of soils* 34: 140-143
- Yan F, Feurle R, Schäffer S, Fortmeier H, Schubert S (1998) Adaptation of active proton pumping and plasmalemma ATPase activity of corn roots to low root medium pH. *Plant Physiology* 117: 311-319
- Young, EF, Taylor RM, Petersen HD (1980) Day-degree units and time in relation to vegetative development and fruiting for three cultivars of cotton. *Crop Science*, 20: 370-374.
- Young J, DeWitt N, Sussman M (1998) A Transgene encoding a plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase that confers acid resistance in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Genetics* 149:501-507

Youssef R, Chino M (1989) Studies on the behaviour of nutrients in the rhizosphere. I.

Establishment of a new rhizobox system to study nutrient status in the rhizosphere.

Journal Plant Nutrition 10: 1185-1195.

Yu Q, Tang C, Kuo J (2000) A critical review on methods to measure apoplastic pH in

plants. Plant and Soil 219: 29-40.

Zapata F, Danso SKA, Hardarson G, Fried M (1987) Time Course of Nitrogen Fixation in

Field-Grown Soybean Using Nitrogen-15 Methodology. Agronomy Journal 79:

172-176

Zhu Y, Di T, Xu G, Chen X, Zeng H, Yan F, Shen Q (2009) Adaptation of plasma

membrane H<sup>+</sup> ATPase of rice roots to low pH as related to ammonium nutrition.

*Plant, Cell and Environment* **32**: 1428–1440

## ANEXO

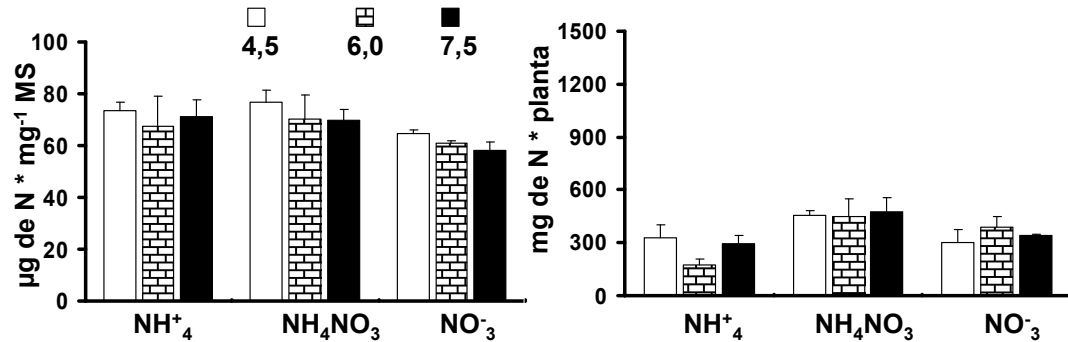


Figura A 1 Concentración de N expresado en  $\mu\text{g de N mg}^{-1}$  de materia seca (PS) y contenido total (mg) de N (N total) por planta de Algodón bajo diferentes fuente de N y niveles de pH. Tratamientos con la misma letra no difieren significativamente con un  $p < 0,05$  para la interacción y  $a < b < c$ . Las barras indican el error estándar de la media.

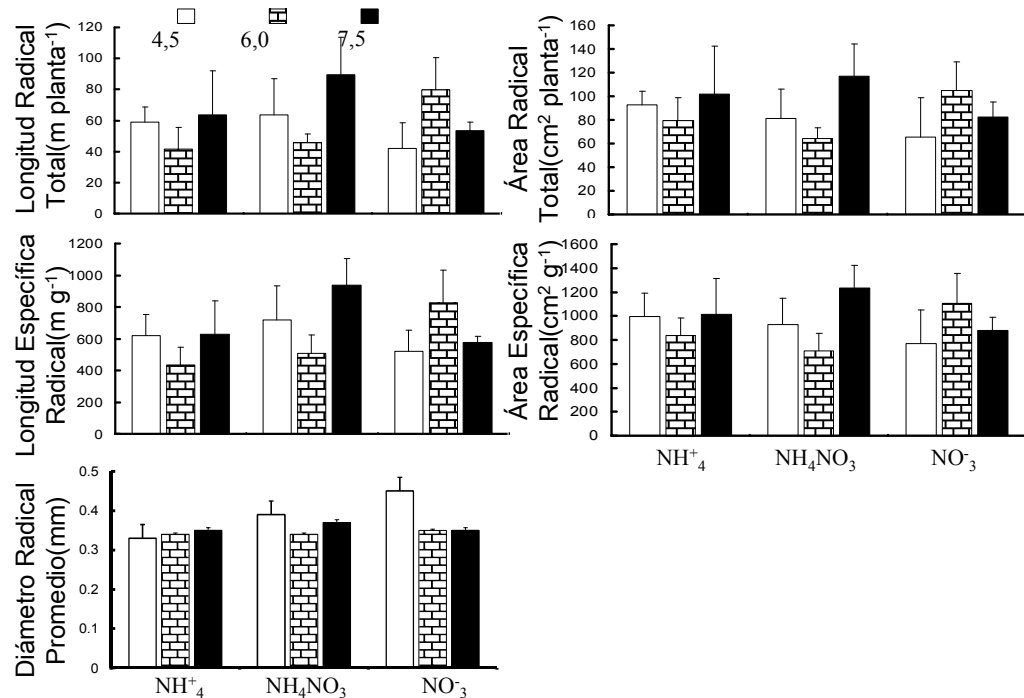


Figura A 2 Características radicales: Longitud radical total ( $\text{m planta}^{-1}$ ), longitud específica radical ( $\text{m g}^{-1}$ ), área radical total ( $\text{cm}^2 \text{planta}^{-1}$ ) y área específica radical ( $\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$ ), y diámetro radical promedio para fuente de N y niveles de pH para plantas de Algodón. Tratamientos con la misma letra no difieren significativamente con un  $p < 0,05$  para la interacción y  $a < b < c$ . Las barras representan el error estándar de las medias

Tabla A 1 Valores de “p” para biomasa total, aérea, radical y relación raíz-tallo (R/T) cuando son tratados con los factores fuente de N niveles de pH y su interacción en plantas de algodón de 32 DDS.

Variables	Factores		Interacción
	Fuente N	pH	N x pH
Longitud radical total-LRT-	0,6721	0,5105	0,2493
Longitud específica radical-LER-	0,7766	0,4079	0,3512
Área radical total-ART-	0,9747	0,5725	0,4134
Área específica radical-AER-	0,9282	0,4671	0,3661
Diámetro radical promedio-DRP-	0,4999	0,3036	0,5089

Niveles de significancia:  $p < 0,05$  (\*);  $p < 0,01$  (\*\*);  $p > 0,05$  (ns)

Tabla A 2 Resultados de Anova y valores de “p” para la tasa de crecimiento de las plantas (TCP) hasta los 33 DDS en plantas de soja del Experimento I.

	TCP
Fuentes de (N)	0,0001 **
Momento (M)	0,0001 **
pH	0,0001 **
N x M	0,0015 **
N x pH	0,1665
pH x M	0,7850
N x M x pH	0,2474

Niveles de significancia:  $p < 0,05$  (\*);  $p < 0,01$  (\*\*);  $p > 0,05$  (ns)

